



**HAL**  
open science

# Dégénérescence des neurones moteurs cortico-spinaux dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique : dynamique spatio-temporelle et mécanismes moléculaires

Christine Marques

► **To cite this version:**

Christine Marques. Dégénérescence des neurones moteurs cortico-spinaux dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique : dynamique spatio-temporelle et mécanismes moléculaires. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ063 . tel-02003576

**HAL Id: tel-02003576**

**<https://theses.hal.science/tel-02003576>**

Submitted on 1 Feb 2019

**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 414**  
Science de la vie et de la santé

**INSERM U1118**

**THÈSE** présentée par :

**Christine MARQUES**

soutenue le : **25 septembre 2017**

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

Discipline / Spécialité : **Neurosciences**

**Dégénérescence des Neurones Moteurs Cortico-Spinaux  
dans un modèle murin de  
Sclérose Latérale Amyotrophique :  
dynamique spatio-temporelle et mécanismes moléculaires**

**THÈSE dirigée par :**  
**Mme ROUAUX Caroline**

Chargée de Recherches INSERM,  
Université de Strasbourg

**M. LOEFFLER Jean-Philippe**

Directeur de Recherches INSERM,  
Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**  
**M. ZYTNIKI Daniel**

Directeur de Recherches CNRS,  
Université Paris Descartes

**Mme STUDER Michèle**

Directeur de Recherches INSERM,  
Université Nice Sophia Antipolis

---

**AUTRE MEMBRE DU JURY :**  
**M. DEVOS David**

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,  
Université de Lille

**M. CHARLET-BERGUERAND Nicolas**

Directeur de Recherches INSERM,  
Université de Strasbourg

*«Let us keep looking, in spite of everything.  
Let us keep searching.  
It is indeed the best method of finding, and perhaps thanks to our efforts,  
the verdict we will give such a patient tomorrow will not be the same  
we must give this patient today.»*

*Jean-Martin Charcot (1889)*

# Remerciements

Cette thèse a été pour moi une expérience unique, le fruit de nombreuses rencontres enrichissantes et de collaboration. Je tiens à remercier très sincèrement toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ma thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le **Dr Jean-Philippe LOEFFLER** pour m'avoir donné l'opportunité de rejoindre son unité de recherche et ainsi bénéficier d'un environnement scientifique de haute qualité. Je tiens à le remercier pour son accueil et ses conseils avisés pour la bonne avancée de ma thèse.

Je suis extrêmement reconnaissante envers ma directrice le **Dr Caroline ROUAUX**, pour son soutien, son intérêt et ses nombreux conseils tout au long de la thèse. Je tiens à la remercier de m'avoir fait confiance en me confiant ce magnifique projet. Madame Rouaux a fait preuve d'humanité et d'écoute et n'a ménagé ni ses efforts ni ses encouragements pour la réussite de ce projet. Avoir pu contribuer à la création et au développement d'une nouvelle thématique au sein du laboratoire avec Madame Rouaux a été une expérience inoubliable et extrêmement enrichissante.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Messieurs les membres du jury : le **Dr Daniel ZYTNICKI**, le **Dr Michèle STUDER**, le **Dr Nicolas CHARLET-BERGUERAND** et le **Dr David DEVOS** pour avoir accepté de lire et examiner ma thèse.

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans le soutien financier versé par les actions **Marie Skłodowska-Curie**, l'**AFM-Téléthon**, une **ERC Starting Grant**, ainsi qu'un cofinancement de thèse **Inserm/Région Alsace**. Je tiens à les remercier de m'avoir permis de me consacrer sereinement à mon projet en m'apportant l'aide financière nécessaire à l'élaboration de mes expériences.

Mes remerciements vont également au **Dr José-Luis GONZALEZ**, au **Dr Luc DUPUIS**, au **Dr Frédérique RENE**, au **Dr Alexandre HENRIQUES**, au **Pr Yves LARMET** et au **Dr Marc DE TAPIA** pour leurs aides, leurs conseils précieux et les nombreuses discussions qui m'ont permis d'évoluer scientifiquement. J'ai eu une chance inouïe d'avoir pu être entourée par des personnes d'aussi grande qualité scientifique et humaine.

Je souhaiterais remercier les membres de la plateforme de cytométrie de flux, **Claudine EBEL**, **Romain KAISER** et **Muriel PHILIPPS** et les membres de la plateforme de séquençage : **Christelle THIBAUT-CARPENTIER**, **Bernard JOST**, **Céline KEIME**, **Cathy HEROUARD**

et **Fabrice AUGE** avec qui j'ai eu l'immense plaisir de collaborer durant ma thèse. Ce projet n'aurait pas été possible sans leur savoir-faire et compétence.

Mes remerciements chaleureux vont également à **Annie PICCHINENNA**, **Sylvie GROSCH**, **Marie-Jo RUIVO** et **Brigitte KUENEMANN** pour m'avoir apporté leur aide lorsque j'en ai eu la nécessité, et tous les bons moments passés ensemble.

Je n'oublierai jamais mes collègues, qui ont su, chacun à leur manière m'apporter du soutien, de la bonne humeur et des souvenirs inoubliables. Je tiens à te remercier **Gina** pour ton soutien, ton écoute, ta joie de vivre et ta bonne humeur, tu as su égayer nos journées. Je garderai en mémoire d'innombrables histoires et souvenirs grâce à toi. Ce fut un plaisir d'avoir pu débiter cette aventure avec toi **Laura**, voisine de bureau et de paillasse, nous avons partagé des moments inoubliables. Je garderai toujours le souvenir de ces années passées avec **Robin** et **Thibaut**, votre humour et joie de vivre nous ont offert d'agréables moments. Merci également à **Imma**, **Hajer**, **Jelena**, **Jérôme**, **Pauline**, **Stéphane**, **Alexandra**, **Althéa**, **Marco**, **Mattia** pour votre gentillesse, pour votre expérience, et pour ces bons moments passés ensemble.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Mathieu** et **Anaïs** pour votre soutien et vos précieuses relectures de ce manuscrit. Un immense merci **Mathieu** pour ton amitié, ta disponibilité, ta générosité et ta bonne humeur. Travailler avec toi a été très formateur et très enrichissant humainement et scientifiquement et des plus agréables. Un grand merci **Anaïs** pour ces 6 mois passés ensemble, pour toute ton aide, ton soutien et ta générosité. Votre contribution a été indispensable à la réalisation de ce projet, je vous en suis très reconnaissante.

Pour terminer, mes remerciements vont tout particulièrement à celles et ceux, qui me sont chers et qui ont fait preuve d'un soutien sans faille tout au long de ce parcours. Leurs attentions, leurs présences et leurs encouragements m'ont donné la force nécessaire pour aller au bout de ce projet. Les mots ne sont pas suffisants pour exprimer toute ma gratitude à leurs égards.

Je souhaite remercier très chaleureusement **mes parents** qui m'ont toujours soutenu dans mes études et mes choix, et sans qui je ne serai pas là aujourd'hui, mais également mes sœurs, **Silvia**, **Sandrine** et **Sophie** et leurs **familles**. Un grand merci à vous, **Sandrine** et **Sophie**, pour vos précieux conseils, votre présence et votre soutien permanent. **Silvia** et **Laurent**, je tiens à vous remercier pour votre accueil, vos encouragements et votre soutien durant mes études. Je tiens à te remercier tout particulièrement **Silvia** pour toute l'aide que tu m'as apportée et pour la force que tu m'as donnée, elles ont été indispensables pour aller jusqu'au bout de ce projet.

# Table des Matières

|   |           |
|---|-----------|
| Liste des tableaux.....   | 9         |
| Liste des figures .....   | 9         |
| Liste des annexes.....  | 10        |
| Abréviations .....  | 11        |
| INTRODUCTION .....  | 13        |
| Chapitre I. Circuit neuronal moteur et motricité volontaire .....                               | 14        |
| <b>1. Vue d'ensemble</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>2. Aires corticales dédiées à l'activité motrice</b> .....                                   | <b>15</b> |
| 2.1 Les aires corticales motrices.....  | 15        |
| 2.2 Organisation fonctionnelle du cortex moteur primaire .....                                  | 17        |
| 2.2.1 Cytoarchitecture du cortex moteur .....   | 18        |
| 2.2.2 Organisation laminaire et populations de neurones glutamatergiques.....                   | 20        |
| 2.2.3 Interneurones .....   | 22        |
| <b>3. Contrôles centraux directs : voies pyramidales</b> .....                                  | <b>22</b> |
| 3.1 Tractus cortico-spinal.....   | 23        |
| 3.2 Tractus cortico-bulbaire .....  | 25        |
| <b>4. Contrôles centraux indirects</b> .....  | <b>27</b> |
| 4.1 Centres de contrôle moteur du tronc cérébral.....   | 27        |
| 4.2 Les voies extra-pyramidales vestibulo-, réticulo-, et rubro-spinales.....                   | 27        |
| <b>5. Les motoneurones bulbaires et spinaux et l'activité motrice</b> .....                     | <b>29</b> |
| 5.1 La moelle épinière .....  | 29        |
| 5.2 Connexions nerveuses aux muscles squelettiques.....   | 30        |
| <b>6. Modulation de l'activité motrice</b> .....  | <b>30</b> |
| Chapitre II. Les Neurones Moteurs Cortico-Spinaux .....   | 32        |
| <b>1. Genèse et spécification moléculaire</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>2. Caractérisation morphologique et anatomique</b> .....                                     | <b>35</b> |
| <b>3. Fonction et modulation</b> .....  | <b>37</b> |
| 3.1 Modulations excitatrices.....   | 37        |
| 3.2 Modulations inhibitrices.....   | 38        |
| <b>4. Maladies des neurones moteurs impliquant les Neurones Moteurs Cortico-Spinaux</b> .....   | <b>38</b> |
| 4.1 Caractéristiques cliniques de l'atteinte des NMCS .....                                     | 39        |
| 4.2 Maladies du neurone moteur associées à l'atteinte des Neurones Moteurs Cortico-Spinaux..... | 39        |
| 4.2.1 Sclérose Latérale Amyotrophique .....   | 41        |
| 4.2.2 Sclérose Latérale Primaire .....  | 41        |
| 4.2.3 Paraplégie Spastique Héritaire.....   | 44        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Chapitre III. Sclérose Latérale Amyotrophique .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>1. Aspects Cliniques.....</b>  | <b>49</b> |
| 1.1 Description clinique.....   | 49        |
| 1.2 Epidémiologie.....  | 50        |
| 1.3 Génétique de la SLA .....   | 50        |
| 1.3.1 Superoxyde Dismutase cytosolique à Cuivre et Zinc (SOD1) .....  | 52        |
| 1.3.2 TAR DNA-Binding Protein-43 (TDP-43) .....   | 55        |
| 1.3.3 Fused in Sarcoma (FUS).....   | 55        |
| 1.3.4 Chromosome 9 Open Reading Frame 72 (C9ORF72) .....  | 56        |
| 1.4 Diversité de la SLA.....  | 56        |
| 1.4.1 Différents sites d'apparition de la maladie.....  | 56        |
| 1.4.2 Variabilité de l'âge de début et de la durée de la maladie .....  | 56        |
| 1.4.3 Diversité des signes cliniques observés .....   | 57        |
| 1.5 Diagnostic et méthodes d'évaluation de la SLA .....   | 59        |
| 1.5.1 Les critères de diagnostics : critères d'El Escorial .....  | 59        |
| 1.5.2 Principales méthodes d'évaluation du diagnostic.....  | 59        |
| 1.5.2.1 Études électrophysiologiques .....  | 59        |
| 1.5.2.2 Études de neuro-imagerie.....   | 62        |
| 1.6 Approches thérapeutiques de la SLA.....   | 62        |
| <b>2. Caractéristiques histopathologiques de la SLA .....</b>   | <b>64</b> |
| <b>3. Modèles animaux.....</b>  | <b>65</b> |
| 3.1 Modèles murins SOD1.....  | 65        |
| 3.2 Autres modèles murins .....   | 69        |
| <b>4. Mécanismes physiopathologiques.....</b>   | <b>70</b> |
| 4.1 Stress oxydant .....  | 70        |
| 4.2 Dysfonctionnement mitochondrial .....   | 72        |
| 4.3 Stress du réticulum endoplasmique .....   | 73        |
| 4.4 Altération du métabolisme des ARN .....   | 74        |
| 4.5 Formation d'agrégats protéiques.....  | 75        |
| 4.6 Altération de l'autophagie.....   | 76        |
| 4.7 Altération du cytosquelette et du transport axonal.....   | 77        |
| 4.8 Neuroinflammation.....  | 78        |
| 4.8.1 Rôle des cellules gliales.....  | 78        |
| 4.8.2 Réaction neuroinflammatoire.....  | 79        |
| 4.9 Excitotoxicité .....  | 80        |
| 4.10 Apoptose neuronale .....   | 82        |
| <b>Chapitre IV. Place du cortex cérébral et des Neurones Moteurs Cortico-Spinaux dans la recherche sur la SLA .....</b> | <b>84</b> |
| <b>1. Altérations du cortex cérébral et des NMCS chez les patients SLA .....</b>  | <b>85</b> |
| 1.1 Données d'imagerie médicale.....  | 85        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 1.1.1     | Anomalies fonctionnelles.....   | 85         |
| 1.1.2     | Anomalies structurales.....   | 87         |
| 1.2       | Données cliniques.....  | 88         |
| 1.3       | Données histopathologiques.....   | 88         |
| <b>2.</b> | <b>Altérations du cortex cérébral et des NMCS dans les modèles murins de SLA.....</b>   | <b>90</b>  |
| 2.1       | Dégénérescence progressive des NMCS.....  | 90         |
| 2.2       | Hyperexcitabilité des NMCS.....   | 93         |
| 2.3       | Atteinte des interneurons inhibiteurs corticaux.....  | 93         |
| <b>3.</b> | <b>Initiation et propagation de la dégénérescence dans la SLA : le débat.....</b>   | <b>94</b>  |
| 3.1       | Atteintes indépendantes des NMCS et des MnBS.....   | 94         |
| 3.2       | Propagation rétrograde, ascendante ou « <i>dying-back</i> ».....  | 96         |
| 3.3       | Propagation antérograde, descendante ou « <i>dying-forward</i> ».....   | 97         |
| <b>4.</b> | <b>Arguments en faveur d'une origine corticale de la maladie.....</b>   | <b>97</b>  |
| 4.1       | Arguments génétiques.....   | 97         |
| 4.2       | Arguments cliniques.....  | 98         |
| 4.3       | Arguments pathologiques.....  | 99         |
| 4.4       | Arguments précliniques.....   | 100        |
|           | <b>PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF DE LA THÈSE.....</b>   | <b>103</b> |
|           | <b>RÉSULTATS.....</b>   | <b>107</b> |
| <b>1.</b> | <b>La perte précoce des neurones moteurs cortico-spinaux implique de nouveaux acteurs moléculaires dans la sclérose latérale amyotrophique.....</b>                       | <b>108</b> |
| <b>2.</b> | <b>Développement d'une approche expérimentale permettant la purification de populations de neurones corticaux à partir de cerveaux individuels de souris adultes.....</b> | <b>148</b> |
| <b>3.</b> | <b>Caractérisation de la pathologie corticale chez les souris <i>Sod1<sup>G86R</sup></i>.....</b>   | <b>181</b> |
| 3.1       | Introduction.....   | 181        |
| 3.2       | Matériel et méthodes.....   | 182        |
| 3.2.1     | Animaux.....  | 182        |
| 3.2.2     | Collection des échantillons.....  | 182        |
| 3.2.3     | RT-qPCR.....  | 182        |
| 3.2.4     | Sélection des gènes candidats d'après les données publiées.....   | 183        |
| 3.2.5     | Analyse statistique.....  | 183        |
| 3.3       | Résultats et discussion.....  | 183        |
| 3.3.1     | La pathologie corticale semble exclure une réaction gliale massive caractéristique de la pathologie spinale dans le modèle murin <i>Sod1<sup>G86R</sup></i> .....         | 183        |
| 3.3.2     | Établissement d'une liste de gènes candidats en vue d'une caractérisation de la pathologie corticale.....   | 186        |
| 3.3.3     | Conclusion.....   | 186        |
|           | <b>DISCUSSION.....</b>  | <b>192</b> |



|  |            |
|--|------------|
| <b>1. Dynamique spatio-temporelle de l'atteinte des NMCS .....</b>   | <b>194</b> |
| 1.1 L'atteinte des neurones moteurs cortico-spinaux est progressive .....  | 194        |
| 1.2 L'atteinte des neurones moteurs cortico-spinaux suit une dynamique spatio-temporelle .....   | 196        |
| <b>2. L'atteinte précoce des NMCS à projection lombaire met en avant une relation somatotopique des atteintes corticales, spinales et musculaires .....</b>        | <b>198</b> |
| <b>3. La dégénérescence des NMCS semble se produire en l'absence de gliose majeure.....</b>  | <b>201</b> |
| <b>4. L'analyse transcriptomique des NMCS met en évidence de nouveaux acteurs moléculaires pertinents dans la sclérose latérale amyotrophique.....</b>             | <b>203</b> |
| 4.1 Stratégie expérimentale .....  | 203        |
| 4.2 Les données de séquençage révèlent une augmentation des altérations transcriptomiques au cours de la dégénérescence des NMCS .....                             | 204        |
| 4.3 L'analyse RNA-seq révèle différents profils d'expressions géniques.....  | 207        |
| 4.4 Méthodes de validation des données RNA-seq.....  | 210        |
| <b>5. Purification de populations spécifiques de neurones corticaux, une nouvelle approche nécessaire pour l'accès au répertoire génique individuel .....</b>      | <b>212</b> |
| 5.1 L'apport des études du développement cortical dans la mise en place de nouveaux outils destinés aux études de pathologies neurodégénératives .....             | 212        |
| 5.2 Développement d'une nouvelle méthode de purification de populations spécifiques de neurones corticaux à partir de cerveaux de souris adultes individuels. .... | 212        |
| 5.3 Validation de la méthode développée.....   | 215        |
| 5.4 La cytométrie de flux, une méthode de choix pour la purification des neurones corticaux adultes et l'analyse transcriptomique .....                            | 215        |
| 5.5 Un protocole, un éventail d'applications .....   | 217        |
| <b>CONCLUSION .....</b>  | <b>219</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>   | <b>222</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>   | <b>247</b> |

# Liste des tableaux

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tableau 1. | Comparaison des caractéristiques de la SLA, de la SLP et de la PSH.....                                | 42 |
| Tableau 2. | Principaux gènes impliqués dans les cas de SLA familiale.....  | 53 |
| Tableau 3. | Les quatre niveaux de certitude diagnostique de la SLA suivant les critères révisés d'El Escorial..... | 60 |
| Tableau 4. | Principaux modèles murins transgéniques SOD1 de SLA.....   | 66 |

# Liste des figures

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| Figure 1.  | Organisation des principales structures nerveuses impliquées dans l'initiation et le contrôle du mouvement volontaire..... | 16  |
| Figure 2.  | Les principales aires motrices corticales.....   | 16  |
| Figure 3.  | Cartographie des différentes parties du corps sur le cortex moteur : l'homonculus moteur.....                              | 19  |
| Figure 4.  | Cytoarchitecture du cortex cérébral.....   | 21  |
| Figure 5.  | Voie descendante pyramidale : le tractus cortico-spinal et cortico-bulbaire.....   | 24  |
| Figure 6.  | Relation entre l'organisation du tractus cortico-spinal et la capacité d'exécution de mouvements fins.....                 | 26  |
| Figure 7.  | Principales voies extra-pyramidales impliquées dans le contrôle des mouvements.....  | 28  |
| Figure 8.  | Morphologie des Neurones moteurs cortico-spinaux et modulation de leur activité.....                                       | 36  |
| Figure 9.  | Signes cliniques de la dégénérescence des NMCS et des MnBS.....  | 40  |
| Figure 10. | Voies pathologiques communes entre la SLA et la PSH.....   | 46  |
| Figure 11. | Découverte des principales mutations géniques dans la SLA familiale et sporadique.....                                     | 51  |
| Figure 12. | Enzyme superoxyde dismutase 1 dans la SLA.....   | 54  |
| Figure 13. | Continuum sclérose latérale amyotrophique et démence fronto-temporale.....   | 58  |
| Figure 14. | Caractérisation du modèle murin transgénique Sod1 <sup>G86R</sup> .....  | 68  |
| Figure 15. | Mécanismes physiopathologiques identifiés comme étant impliqués dans la SLA.....   | 71  |
| Figure 16. | Atteintes du cortex cérébral chez les patients SLA.....  | 86  |
| Figure 17. | Atteintes histopathologiques du cortex et des NMCS chez les patients SLA.....  | 89  |
| Figure 18. | Atteinte du cortex et des NMCS dans un modèle murin SOD1 de SLA.....   | 91  |
| Figure 19. | Hypothèses du site d'apparition et de la progression de la SLA.....  | 95  |
| Figure 20. | Hypothèse de propagation de la pathologie TDP-43 selon un schéma de type corticofuge dans la SLA.....                      | 101 |

# Liste des annexes

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Annexe 1. | Liste des publications et présentations.....                         | 248 |
| Annexe 2. | Publication N°1 (sous presse) issue de travaux en collaboration..... | 249 |
| Annexe 3. | Publication N°2 (sous presse) issue de travaux en collaboration..... | 251 |

# Abréviations

AAV : *adeno associated virus* (virus adéno-associé)  
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire  
AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionique acid  
C9ORF72 : *chromosome 9 open reading frame 72*  
CTB : toxine de choléra B  
DFT : démence fronto-temporale  
eGFP : *enhanced green fluorescent protein*  
EMG : électromyographie  
FACS : fluorescence-activated cell sorting  
FG : Fluorogold  
FUS : *fused in sarcoma*  
GABA-A : acide  $\gamma$ -aminobutyrique-A  
IRM : imagerie par résonance magnétique  
ITD : imagerie par tenseur de diffusion  
JNM : jonction neuromusculaire  
KO : knock-out  
M1 : cortex moteur primaire  
M2 : cortex prémoteur  
MnB : motoneurones  $\alpha$  bulbaires  
MnBS : motoneurones  $\alpha$  bulbaires et spinaux  
MND : *motor neuron disease*  
MnS : motoneurones  $\alpha$  spinaux  
NCP : neurones calleux de projection  
NMCS : neurones moteurs cortico-spinaux  
NMDA : N-méthyl-D-aspartate  
PEM : potentiel évoqué moteur  
PSH : paraplégie spastique héréditaire  
PV : parvalbumine  
RE : réticulum endoplasmique  
S : aires somatosensorielles  
S1 : aires somatosensorielles primaires  
SLA : sclérose latérale amyotrophique

SLAf : sclérose latérale amyotrophique familiale  
SLAs : sclérose latérale amyotrophique sporadique  
SLP : sclérose latérale primaire  
SMT : stimulation magnétique transcrânienne  
SNC : système nerveux central  
SOD1 : superoxyde dismutase cytosolique à cuivre zinc  
SST : somatostatine  
TARDBP : TAR DNA Binding Protein  
TCB : tractus cortico-bulbaire  
TCS : tractus cortico-spinal  
TDP-43 : TAR DNA Binding Protein - 43  
TEP : tomographie par émission de positrons  
TRAP : *translating ribosome affinity purification*  
TRS : tractus rubro-spinal  
UCHL1 : ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1  
UPR : *unfolded protein response*

# **INTRODUCTION**

## Chapitre I.

# **Circuit neuronal moteur et motricité volontaire**

Avant d'aborder le sujet principal de cette thèse portant sur les neurones moteurs cortico-spinaux (NMCS) et les mécanismes qui régissent leur neurodégénérescence au cours de la sclérose latérale amyotrophique (SLA), je souhaite présenter succinctement le circuit neuronal moteur impliqué dans la motricité volontaire, en insistant plus particulièrement sur le cortex cérébral et la voie descendante directe vers la moelle épinière, le tractus cortico-spinal (TCS), afin de mettre en perspective la fonction des NMCS dans la motricité.

## 1. Vue d'ensemble

Les mouvements volontaires sont le résultat de contractions des muscles squelettiques dont les patterns spatiaux et temporels sont commandés par le cerveau et la moelle épinière. Plus précisément, les muscles squelettiques se contractent à la suite de l'activation des motoneurones  $\alpha$  du tronc cérébral et de la moelle épinière, appelés dans ce manuscrit motoneurones  $\alpha$  bulbaires (MnB), motoneurones  $\alpha$  spinaux (MnS) ou encore motoneurones  $\alpha$  bulbaires et spinaux (MnBS). Ces MnBS sont contrôlés par les neurones moteurs des centres supérieurs : directement par des projections monosynaptiques (minorité des MnBS) ou indirectement par des projections disynaptiques impliquant les interneurons locaux du tronc cérébral et de la moelle épinière (majorité des MnBS) (Kandel et al., 2012; Purves et al., 2011).

L'initiation et le contrôle du mouvement volontaire sont permis par l'activation d'une voie directe cortico-spinale. Cette voie implique principalement les NMCS du cortex moteur qui, au niveau du tronc cérébral ou de la moelle épinière, projettent directement ou indirectement (via des interneurons), sur les MnB et MnS responsables de l'innervation des muscles de la face ou des membres. La coordination et la régulation des mouvements sont assurées par une voie indirecte impliquant les neurones moteurs des centres moteurs du tronc cérébral qui projettent également directement ou indirectement vers les MnB et MnS, ainsi que par le cervelet et les ganglions de la base, par le biais de connexions réciproques avec les centres énumérés ci-dessus (Kandel et al., 2012; Purves et al., 2011) (Figure 1).

## 2. Aires corticales dédiées à l'activité motrice

### 2.1 Les aires corticales motrices

Dans le cortex cérébral, différentes aires corticales, fortement interconnectées, sont impliquées dans la planification, la programmation et l'exécution des mouvements.



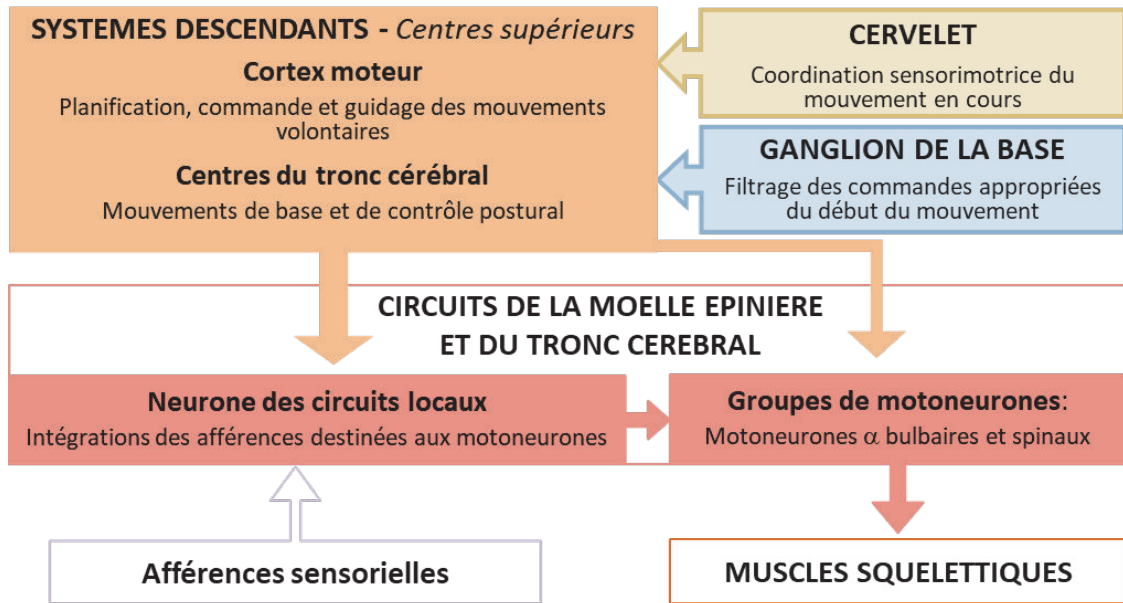


Figure 1. **Organisation des principales structures nerveuses impliquées dans l'initiation et le contrôle du mouvement volontaire**

Quatre grands systèmes sont impliqués dans le contrôle moteur : les centres supérieurs : le cortex moteur et les voies descendantes du tronc cérébral, les ganglions de la base, le cervelet et les MnBS. Le cervelet et les ganglions de la base influencent le cortex moteur au travers des connexions vers le thalamus. Le cortex moteur détermine quels groupes musculaires sont activés et la grandeur de la force à exercer. À partir des afférences du cortex moteur, des ganglions de la base, du cervelet et des noyaux du tronc cérébral, la moelle épinière initie des contractions musculaires appropriées pour accomplir un mouvement souhaité (adaptée de <http://www.servier.fr/slidekit/item> et (Purves et al., 2011)).

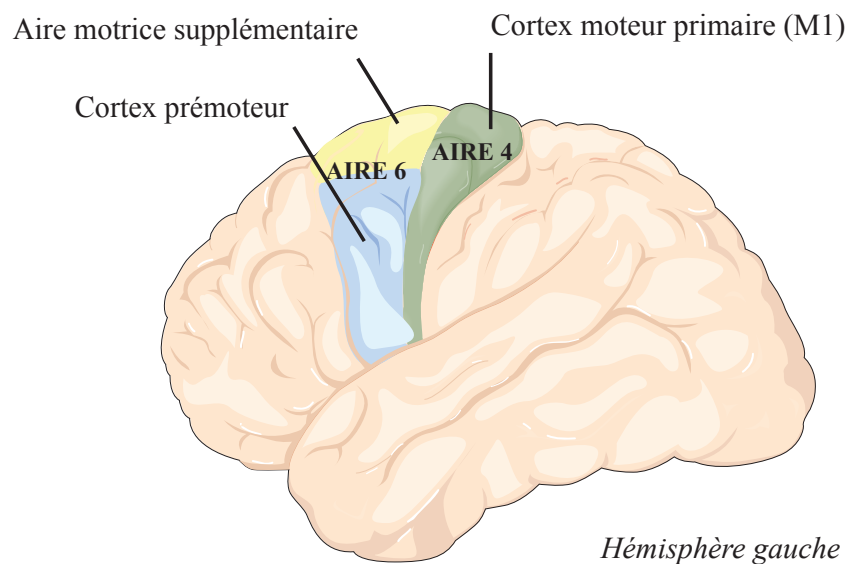


Figure 2. **Les principales aires motrices corticales**

Les aires motrices corticales se situent en grande partie dans l'aire 4 et l'aire 6 de Brodmann. L'aire 4 se situe en avant du sillon central et correspond au cortex moteur primaire (M1). L'aire 6 comprend l'aire motrice supplémentaire située en grande partie sur la partie médiale du cerveau et le cortex prémoteur qui se situe dans la partie latérale (adaptée de <http://www.servier.fr/slidekit/item>).

Le cortex moteur humain, situé dans la partie postérieure du lobe frontal, en avant du sillon central, contient les principales aires impliquées : l'aire 4 de Brodmann correspondant au cortex moteur primaire (M1), qui occupe le territoire cortical du gyrus central, et l'aire 6 de Brodmann incluant l'aire motrice supplémentaire et le cortex prémoteur (Fulton, 1935; Roland et al., 1980) (Figure 2). Le cortex moteur reçoit deux grands types d'afférences : celles qui permettent de déclencher la génération de l'information motrice par le cortex moteur, et celles qui permettent de réguler cette information motrice. Les aires corticales cognitives des lobes frontaux (cortex préfrontal) sont responsables de la planification et de la commande de mouvements volontaires. Les aires sensorielles des lobes occipitaux, pariétaux et temporaux transmettent quant à elles des informations sensorielles qui vont permettre d'initier des mouvements en réponse aux perceptions sensorielles (visuelles, auditives, tactiles...) de l'environnement (Kandel et al., 2012; Vesia et al., 2013). Les neurones de ces aires corticales motrices reçoivent également des afférences régulatrices en provenance des deux grands centres de régulation du système moteur, les ganglions de la base et le cervelet, que nous traiterons plus loin dans ce chapitre (Kandel et al., 2012). Les aires corticales associées à la motricité chez les rongeurs comportent également une aire motrice primaire (M1), une aire motrice secondaire (M2) et les aires somatosensorielles (S) des membres antérieurs et postérieurs (Paxinos & Watson, 2007). Le M1 est décrit comme l'aire centrale du cortex moteur, responsable de l'activation du circuit moteur (Kandel et al., 2012). Il contient des neurones moteurs géants, initialement décrits par Vladimir Betz en 1874, et connus sous le nom de cellules de Betz (Betz, 1874), une sous-population des NMCS. En effet, le M1 contient la majorité des NMCS (cellules de Betz et autres) qui projettent vers la moelle épinière et qui constituent une grande part du TCS (Lemon, 2008; Murray & Coulter, 1981). Cependant, d'autres NMCS sont également présents au niveau des aires pariétales et frontales telles que les aires prémotrices (M2) et somatosensorielles primaires (S1). Ainsi, si ces aires ne possèdent pas à proprement parler de cellules de Betz, elles possèdent néanmoins elles aussi des NMCS, qui projettent vers la moelle épinière et contribuent au TCS (Galea & Darian-Smith, 1994).

Ainsi, sous l'influence des aires cognitives et sensorielles, l'information motrice est générée au sein des aires motrices par les NMCS, modulée par le cervelet et les ganglions de la base, et transmise, via les axones de ces NMCS qui forment le TCS, vers le tronc cérébral et la moelle épinière.

### **2.2 Organisation fonctionnelle du cortex moteur primaire**

L'organisation fonctionnelle du M1 a été étudiée au travers d'observations cliniques et de recherches expérimentales. C'est à la fin du vingtième siècle, par des études expérimentales de « stimulations corticales » *in vivo* de diverses régions du cortex moteur que Sherrington et Penfield

ont dressé une cartographie fonctionnelle des zones corticales M1 liées au mouvement (Grunbaum & Sherrington, 1901; Leyton & Sherrington, 1917). À chaque muscle a été fait correspondre une région corticale. Cette organisation somatotopique de la carte motrice met en évidence une large disproportion des représentations des parties du corps. Elle correspond au degré de complexité des mouvements que chaque membre peut effectuer, avec une surface corticale plus grande occupée par la musculature associée à un contrôle moteur fin (face, bouche, main) qui requiert des fonctions motrices plus complexes (Penfield & Boldrey, 1937; Penfield & Rasmussen, 1952) (Figure 3).

Toutefois, des études plus récentes remettent en question l'organisation fonctionnelle des zones motrices M1 du cortex cérébral. Selon ces études, cette organisation n'est pas simplement une carte isomorphe du corps dans laquelle les membres avoisinants sont représentés dans des sites corticaux adjacents (pour revue, voir (Graziano et al., 2002)). En effet, les muscles individuels sont représentés dans le M1 (dans la région représentant le membre étudié) à plusieurs reprises selon une mosaïque complexe. D'autre part, il a été montré que la stimulation focale de neurones entraîne la contraction de plusieurs muscles (Kwan et al., 1978; Park et al., 2001). Ainsi, selon ces études, ce sont les mouvements plus que les muscles individuels qui sont codés par l'activité des neurones corticaux. Ces neurones corticaux sont reliés entre eux par des circuits locaux permettant la coordination de l'activité neuronale dans différents sites de la carte afin de permettre la génération de commandes motrices précises (Graziano et al., 2002; Schieber, 2007). Cela permet au cortex d'organiser des combinaisons de mouvements adaptés à des tâches spécifiques. Ainsi, même de petites lésions du TCS peuvent avoir de grandes conséquences motrices, en affectant un nombre important de muscles dans différentes parties du corps (Schieber, 2007).

### 2.2.1 Cytoarchitecture du cortex moteur

Le cortex moteur, à l'instar du reste du cortex cérébral, est essentiellement constitué de deux types neuronaux : les neurones excitateurs glutamatergiques (80% des neurones corticaux) et les interneurons inhibiteurs GABAergiques (20% des neurones corticaux). Les neurones excitateurs sont majoritairement pyramidaux (à l'exception des neurones stellaires de la couche IV), et connectent des cibles très éloignées de leur corps cellulaire. En revanche, les interneurons inhibiteurs GABAergiques ont pour rôle de moduler localement l'activité des neurones excitateurs par le biais d'axones émis sur des distances relativement courtes (Kandel et al., 2012; Purves et al., 2011).

À ces neurones excitateurs et inhibiteurs s'ajoutent naturellement des cellules gliales (astrocytes, microglies et oligodendrocytes). Malgré l'apparente simplicité des deux grandes classes de neurones corticaux, le cortex cérébral en général, et moteur en particulier, sont des structures complexes, hautement organisées, composées de six couches cellulaires (Figure 4).

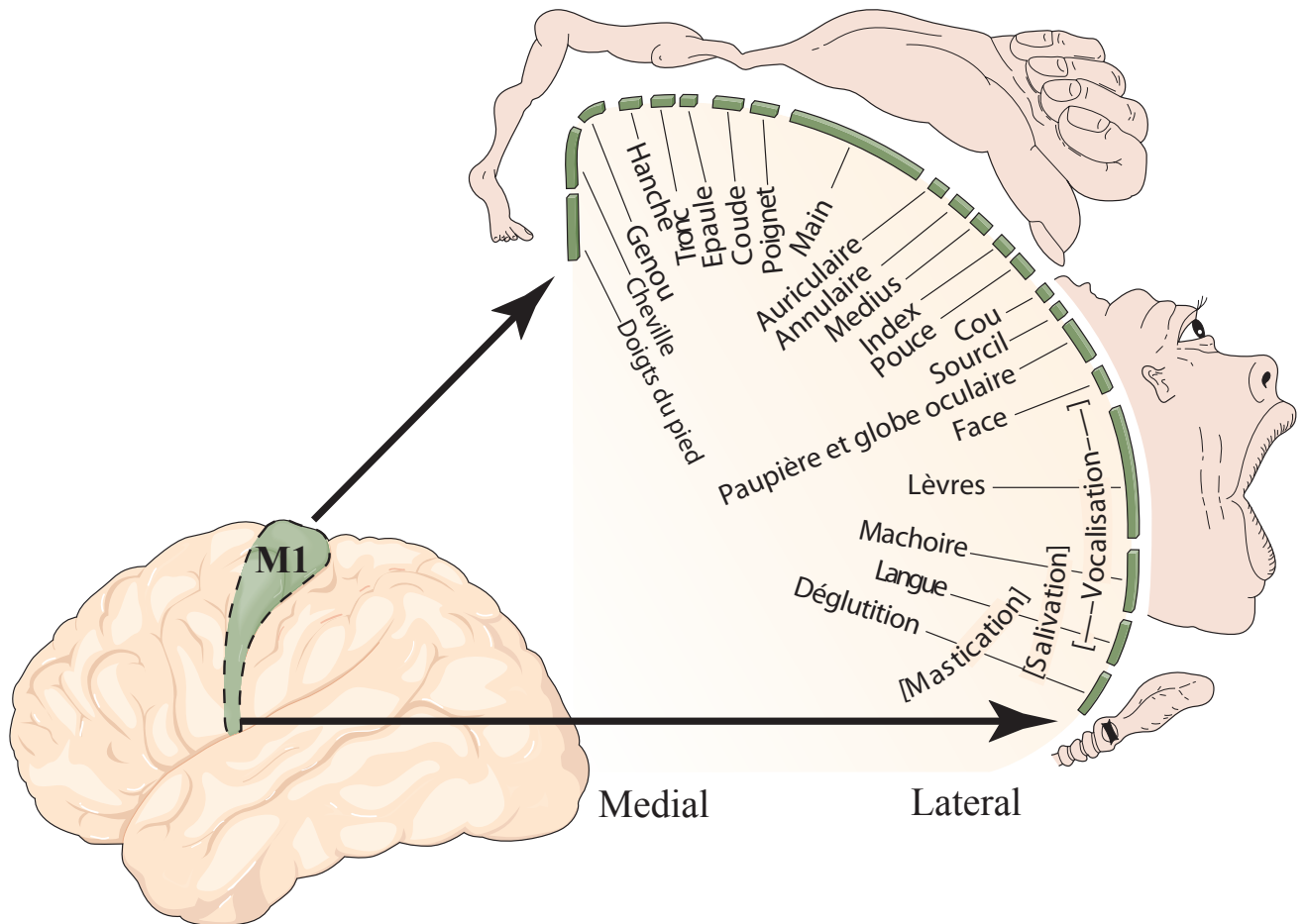


Figure 3. Cartographie des différentes parties du corps sur le cortex moteur : l'homunculus moteur

L'homunculus moteur est la carte topographique du cortex moteur, qui correspond à l'organisation de la commande motrice des parties du corps à la surface du cortex moteur (adaptée de(Kandel et al., 2012)).

Ces couches se distinguent sur la base 1) de la densité, de la taille et de la forme des cellules qui les composent ; 2) des combinaisons de gènes exprimés par ces populations cellulaires, et 3), des connexions émises et reçues par ces populations cellulaires. La classification des six couches cellulaires est classiquement établie sur la base des projections émises par les neurones excitateurs qui les composent.

### **2.2.2 Organisation laminaire et populations de neurones glutamatergiques**

Des méninges en surface vers le corps calleux en profondeur, le cortex cérébral est organisé en six couches cellulaires. La couche I, la plus superficielle, pauvre en neurones, se compose essentiellement de cellules gliales ainsi que des arborisations des dendrites apicales des neurones pyramidaux des autres couches (dont les NMCS). Ces terminaisons dendritiques reçoivent des projections des neurones corticaux et des neurones thalamo-corticaux. Ces neurones thalamo-corticaux projettent vers toutes les couches du cortex cérébral à l'exception de la couche VI (Rubio-Garrido et al., 2009). Les couches II et III sont composées quant à elles de neurones cortico-corticaux, qui envoient des connexions en ipsilatéral vers des aires corticales plus rostrales ou plus caudales, ou en contralatéral via le corps calleux, et reçoivent des afférences cortico-corticales. Les neurones cortico-corticaux dont l'axone emprunte le corps calleux sont également appelés neurones calleux de projection (NCP) (Fame et al., 2011). La couche IV est composée d'interneurones excitateurs avec une morphologie principalement stellaire, recevant essentiellement des projections sensorielles du thalamus et émettant des projections au sein d'une même colonne corticale (Lefort et al., 2009; Lübke et al., 2000; Staiger et al., 2004).

La couche V se subdivise en couche Va et Vb. La couche Va, superficielle, contient des neurones de projection calleuse et des neurones cortico-striataux (Mitchell & Macklis, 2005) tandis que la couche Vb contient des neurones de projection subcorticale. Dans le cas des aires motrices, il s'agit en grande partie de NMCS qui connectent le cortex à la moelle épinière en faisant des collatérales vers le striatum, le noyau rouge et le pont (Rivara et al., 2003). Enfin, la couche VI, la plus profonde, contient les neurones cortico-thalamiques qui, en fonction des aires corticales, projettent vers différents noyaux du thalamus (Kandel et al., 2012) (Figure 4). Outre leur forme pyramidale typique et leur long prolongement axonal, les neurones excitateurs corticaux possèdent également une large dendrite apicale, très ramifiée ainsi que des dendrites basales. Cette arborisation dendritique typique leur permet de recevoir la plupart des afférences excitatrices et inhibitrices. Les couches I et II/III contiennent les dendrites apicales des neurones des couches II/III, V et VI, tandis que les couches V et VI contiennent les dendrites basales des neurones des couches III, V et VI (Kandel et al., 2012).

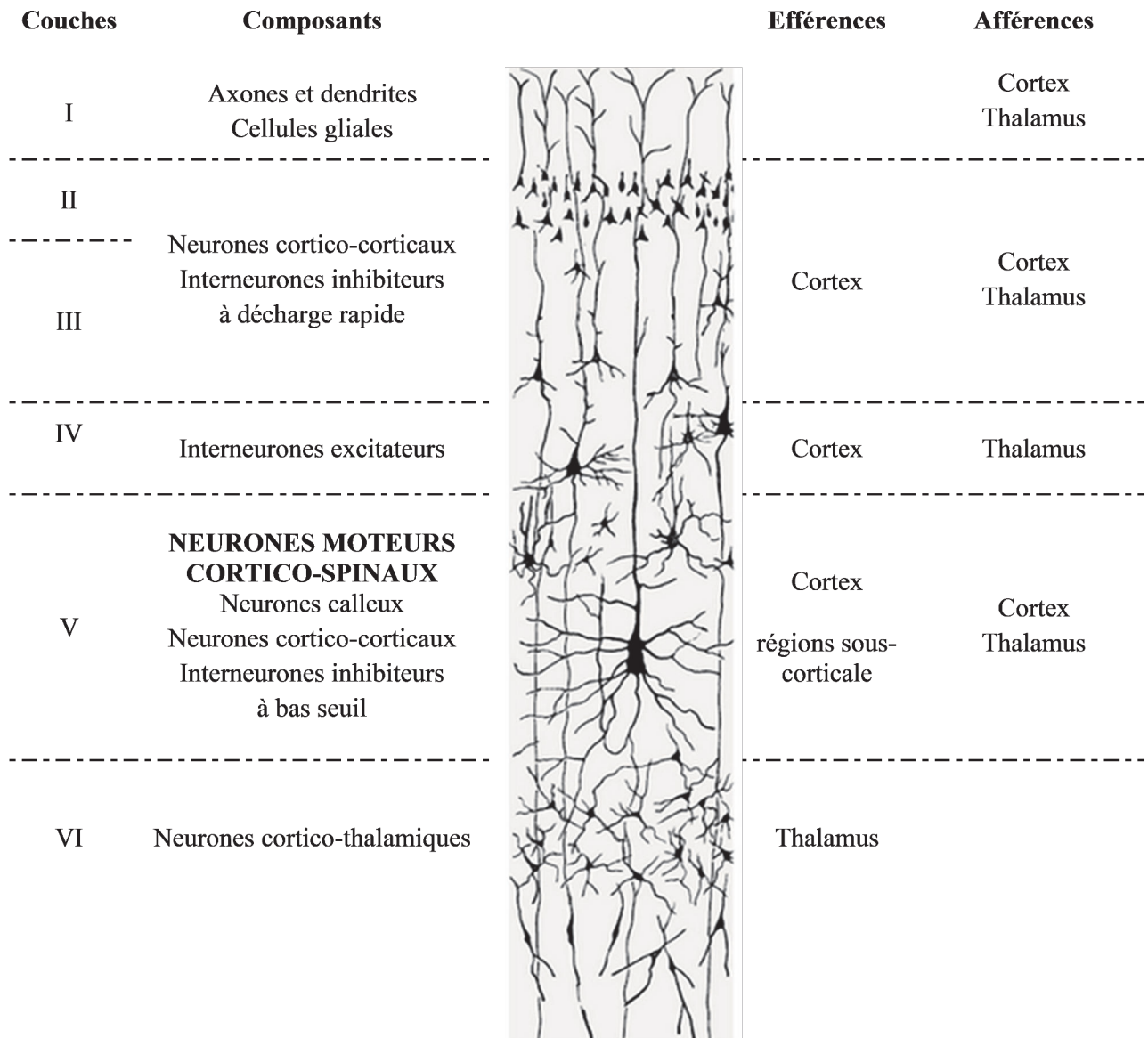


Figure 4. **Cytoarchitecture du cortex cérébral**

Le cortex cérébral est organisé en 6 couches constituées de neurones excitateurs glutamatergiques (80%), d'interneurones inhibiteurs GABAergiques (20%) et de cellules gliales. Ces populations cellulaires émettent (efférences) et reçoivent (afférences) des projections spécifiques de régions corticales, subcorticales (adaptée de <http://epomedicine.com/medical-students/cerebral-cortex-layers-microanatomy-simplified/>).

### 2.2.3 Interneurones

En plus des neurones excitateurs corticaux, des interneurones sont présents dans chacune des couches et peuvent recevoir les mêmes afférences que les cellules pyramidales. Il en existe une grande variété qui se distingue notamment par leur morphologie cellulaire, leurs connexions synaptiques et leurs propriétés moléculaires (expression de différents neuropeptides et de protéines de liaison au calcium) (Markram et al., 2004).

Chez la souris, 3 principaux groupes d'interneurones à rôle distinct ont été décrits, ceux exprimant : la parvalbumine (PV), le récepteur sérotoninergique 3A (5-hydroxytryptamine 3A, 5-HT<sub>3A</sub>) et le neuropeptide somatostatine (SST) (Rudy et al., 2011; Xu et al., 2010).

Dans le cortex, les interneurones PV sont généralement des interneurones à décharge rapide qui reçoivent des projections intracorticales excitatrices. Ces interneurones des couches II et III du cortex cérébral font de forts contacts inhibiteurs sur les neurones pyramidaux cibles, tels que les NMCS (Rudy et al., 2011).

En revanche, les interneurones exprimant 5-HT<sub>3A</sub> présents dans les couches plus superficielles du cortex ont une fonction moins connue (Xu et al., 2010). Un sous-groupe de ces neurones, co-exprime le neuropeptide vasoactif intestinal (VIP) (interneurone à bas seuil), semble communiquer notamment avec les interneurones SST et est particulièrement excité par des projections intracorticales (Lee et al., 2013; Rudy et al., 2011; Xu et al., 2010).

Les interneurones SST du troisième groupe (interneurones à bas seuil) se composent en grande partie de cellules avec un axone projetant vers la couche I et sont localisés dans la couche V du cortex cérébral (Markram et al., 2004), et forment des contacts le long des dendrites des neurones pyramidaux, dont les NMCS (Chiu et al., 2013; Wang, Toledo-Rodriguez, et al., 2004).

En retour, les interneurones SST reçoivent des projections des cellules pyramidales voisines, ce qui les rend sensibles à l'activité du réseau neuronal local (Rudy et al., 2011; Silberberg & Markram, 2007) (Figure 4).

L'inhibition des neurones de projection subcérébrale, dont font partie les NMCS, proviennent principalement des interneurones PV et SST (détaillé dans la partie II. 3).

## 3. Contrôles centraux directs : voies pyramidales

Le terme de voie pyramidale désigne les tractus cortico-spinal (TCS) et cortico-bulbaire (TCB). Son nom vient du fait qu'elle traverse les pyramides bulbaires. Cette voie relie le cortex moteur à l'étage bulbaire ou spinal, et correspond à la voie directe de la motricité volontaire.

### 3.1 Tractus cortico-spinal

Le TCS se compose de fibres de NMCS situées majoritairement dans le M1 (Campbell, 1904; Galea & Darian-Smith, 1994). Bien qu'il soit souvent considéré que les cellules de Betz sont les seuls neurones à l'origine des projections cortico-spinales, elles ne constituent en réalité qu'une sous-population des NMCS projetant dans ce tractus. En effet, seulement 3% des fibres proviennent des cellules Betz (Lassek & Wheatley, 1945; Schieber, 2007).

Les axones des NMCS se regroupent dans de grands faisceaux qui empruntent la capsule interne pour traverser le striatum et convergent vers le pédoncule cérébral jusqu'au pont. Chez l'homme, 80% des axones croisent la ligne médiane au niveau de la jonction bulbo-médullaire, et entrent ainsi dans la moelle épinière. Les axones descendent alors dans le cordon controlatéral de la moelle épinière, encore appelé faisceau cortico-spinal latéral. Depuis ce faisceau, un contingent de fibres issues essentiellement des cellules de Betz du M1 entre dans la substance grise, se ramifie intensément et établit des connexions excitatrices monosynaptiques, directes, avec les MnS situés dans la corne ventrale (Rathelot & Strick, 2006). Les fibres restantes projettent sur les interneurons locaux, impliqués dans la coordination des activités des MnS. De par la distribution de ces fibres, notamment les projections directes sur les MnS (Kandel et al., 2012; Kuypers, 1982; Schieber, 2007), il apparaît que le TCS latéral humain a un rôle important dans le contrôle des mouvements fins et individualisés des doigts (Muir & Lemon, 1983). Par ailleurs, il a été proposé que les connexions synaptiques indirectes permettraient au TCS de moduler les réflexes et réseaux locomoteurs spinaux à l'origine des rythmes locomoteurs tels que la marche (Barthélemy et al., 2011).

Les 20% des fibres restantes descendent directement le long du cordon ventral ipsilatéral de la moelle épinière (faisceau cortico-spinal ventral). Ces neurones projettent essentiellement sur les interneurons (ipsilatéraux ou controlatéraux) qui seraient responsables du contrôle de la musculature axiale et proximale des membres (nuque, tronc, épaules). Bien que le rôle fonctionnel du TCS ventral ne soit pas encore bien connu, la répartition des fibres sur la moelle épinière suggère qu'il pourrait être impliqué dans le maintien de la posture (Kuypers, 1982; Rosenzweig et al., 2009; Schieber, 2007) (Figure 5).

Outre les fibres émanant de M1, le TCS contient également des fibres provenant d'autres aires sensorimotrices (les aires prémotrices M2 et les aires pariétales du cortex somatosensoriel primaire S1). Chez le singe, la majorité des fibres du M2 se termine au niveau de la corne dorsale tandis que celles provenant de S1 se terminent dans la zone intermédiaire de la moelle épinière (Galea & Darian-Smith, 1994). Ces fibres, de par leurs terminaisons, seraient impliquées dans la régulation des afférences sensorielles, des réflexes spinaux et des circuits locaux des interneurons (Lemon, 2008; Wall & Lidierth, 1997).



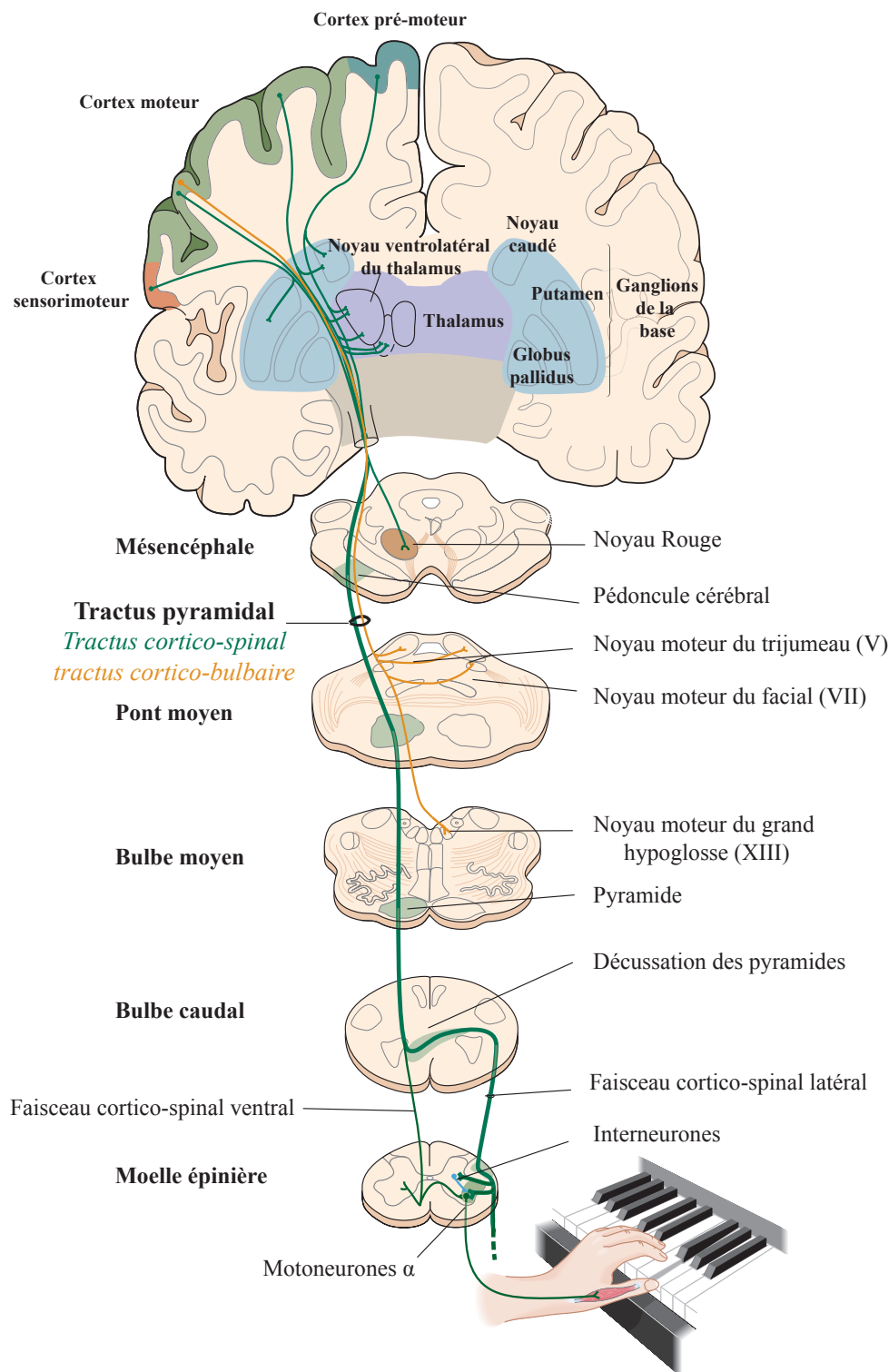


Figure 5. Voie descendante pyramidale : le tractus cortico-spinal et cortico-bulbaire

Les voies pyramidales se composent du tractus cortico-spinal (TCS) et cortico-bulbaire (TCB) qui relie le cortex à l'étage bulbaire ou spinal. La majorité des fibres du TCS croisent à la décussation des pyramides et forment le faisceau cortico-spinal latéral. Une minorité des fibres cheminent du côté ipsilatéral et croisent au niveau médullaire des muscles qu'elles innervent. Un faible pourcentage de fibres ne croise pas et innerve des muscles ipsilatéraux (adaptée de (Kandel et al., 2012)).

Il existe des variations importantes de l'organisation du TCS entre espèces, et notamment entre l'homme et les rongeurs (Lemon, 2008). En effet, chez les rongeurs, la majorité des axones du TCS croise également la ligne médiane, mais au lieu de descendre latéralement, ils demeurent le long de la ligne médiane, au sein du funicule dorsal de la moelle épinière. Le reste des axones du TCS descend le long de la colonne ventrale ipsilatérale, comme chez l'homme. Chez le rongeur, le TCS se termine majoritairement au niveau de la corne dorsale et connecte les MnS situés dans la corne ventrale, via un réseau disynaptique impliquant des interneurons spinaux (D'Acunzo et al., 2014; Lemon, 2008; Schieber, 2007).

Il est admis qu'au cours de l'évolution les terminaisons cortico-spinales se sont déplacées progressivement de la corne dorsale vers la corne ventrale de la moelle épinière, et d'une transmission de l'information motrice part un mode majoritairement plurisynaptique à un mode majoritairement monosynaptique. Ces variations interespèces de l'organisation du TCS et du mode de transmission de l'information motrice pourraient expliquer les différences connues entre les espèces, notamment dans l'exécution de mouvements fins et individualisés (Lemon, 2008; Lemon & Griffiths, 2005; Schieber, 2007) (Figure 6).

Quels que soient l'espèce et le trajet spécifique du TCS, la majorité des fibres provenant de la représentation des membres supérieurs dans le cortex cérébral se termine au niveau de la moelle épinière cervicale tandis que les fibres provenant de la représentation des membres inférieurs se terminent au niveau de la moelle épinière lombosacrée (Schieber, 2007).

### **3.2 Tractus cortico-bulbaire**

Les neurones corticaux impliqués dans le contrôle des muscles de la tête et du cou, situés au niveau de la partie inférieure du gyrus précentral (à la face externe du lobe frontal) forment le TCB. Le trajet du TCB est semblable à celui du TCS. Les fibres cortico-bulbaires cheminent avec les fibres cortico-spinales, pour se terminer, à différents niveaux du tronc cérébral, sur les noyaux moteurs des nerfs crâniens, la formation réticulaire et le noyau rouge (Kuypers, 1958). Les fibres du TCB contrôlent les MnB situés au niveau des noyaux des nerfs crâniens, directement ou indirectement par des connexions avec des interneurons locaux. De plus, la majorité des fibres innervant les noyaux moteurs du tronc cérébral se terminent bilatéralement, hormis les fibres contrôlant la langue (noyau de l'hypoglosse - XII) et la musculature de la face inférieure (noyau du facial - VII) qui se terminent en controlatéral (Kandel et al., 2012; Purves et al., 2011) (cf. Figure 5).

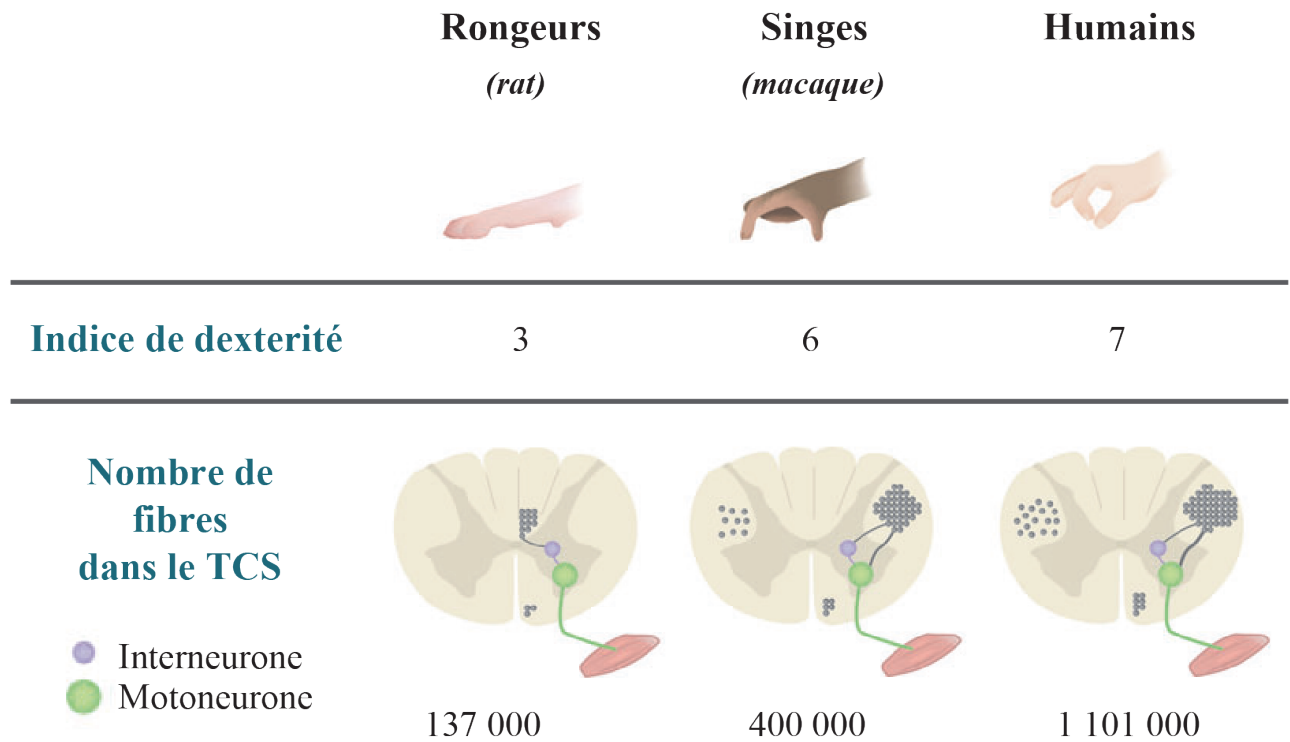


Figure 6. **Relation entre l'organisation du tractus cortico-spinal et la capacité d'exécution de mouvements fins**

Chez les rongeurs, les fibres du tractus cortico-spinal (TCS) cheminent majoritairement dans le funicule dorsal de la moelle épinière et connectent les MnBS via des interneurones locaux. Chez les primates non-humains et l'homme, les connexions directes (monosynaptiques) avec les MnBS se sont développées et le nombre de fibres peuplant le TCS a augmenté. Contrairement aux rongeurs, la majorité des fibres chemine dans le cordon controlatéral de la moelle épinière. Dans les trois espèces, une minorité de fibres cheminent ipsilatéralement. Le développement du TCS corrèle avec l'index de dextérité, tel que la préhension d'objet et des mouvements précis (adaptée de(Lemon, 2008)).

En plus d'influencer directement la moelle épinière par l'intermédiaire du TCS, le cortex cérébral établit également des connexions avec d'autres voies descendantes indirectes ayant pour origine les centres moteurs du tronc cérébral. Ces voies alternatives indirectes interviennent essentiellement dans l'ajustement postural durant les mouvements.

## **4. Contrôles centraux indirects**

Les aires corticales des lobes frontaux, ainsi que d'autres régions cérébrales, telles que l'oreille interne, contrôlent les mouvements indirectement en envoyant des projections vers divers centres moteurs du tronc cérébral. Les neurones moteurs supérieurs des voies indirectes, qui prennent naissance dans ces centres du tronc cérébral, projettent le long de faisceaux pour faire synapse sur les interneurons locaux ou les MnBS (Kandel et al., 2012; Purves et al., 2011).

### **4.1 Centres de contrôle moteur du tronc cérébral**

Au sein du tronc cérébral, il existe différents centres de contrôle moteur impliqués dans la posture, la locomotion et la motricité oro-faciale. Parmi ces centres, les noyaux vestibulaires reçoivent des informations sensorielles provenant de l'oreille interne (appareil vestibulaire) les renseignant sur la position spatio-temporelle de la tête, et sont impliqués dans le contrôle de l'équilibre (Purves et al., 2011). La formation réticulaire ponto-médullaire reçoit quant à elle des afférences corticales essentiellement du M1 et du M2, et joue un rôle dans les ajustements posturaux (pour revue, voir (Baker, 2011)). Enfin, le noyau rouge reçoit des afférences cortico-bulbaires des aires 4 et 6 du cortex moteur, des collatérales d'axones du TCS (Humphrey et al., 1984; Kuypers & Lawrence, 1967) ainsi que des projections du cervelet. Il participe au contrôle moteur des membres supérieurs (Purves et al., 2011) (Figure 7).

### **4.2 Les voies extra-pyramidales vestibulo-, réticulo-, et rubro-spinales**

De ces trois centres, trois voies indirectes, appelées voies extra-pyramidales, descendent vers la moelle épinière. Les neurones du noyau vestibulaire cheminent le long de la partie ventrale de la substance blanche de la moelle épinière en deux faisceaux : les vestibulo-spinaux latéral et médian. Les fibres de ces faisceaux projettent vers la partie médiane de la corne ventrale de la moelle épinière cervicale où se trouvent les MnS impliqués dans la régulation de la posture de la tête et dans le contrôle de la musculature proximale des membres. Ces deux faisceaux jouent un rôle dans l'équilibre, en régulant le tonus musculaire en réponse aux mouvements de la tête (McCall et al., 2017; Purves et al., 2011).

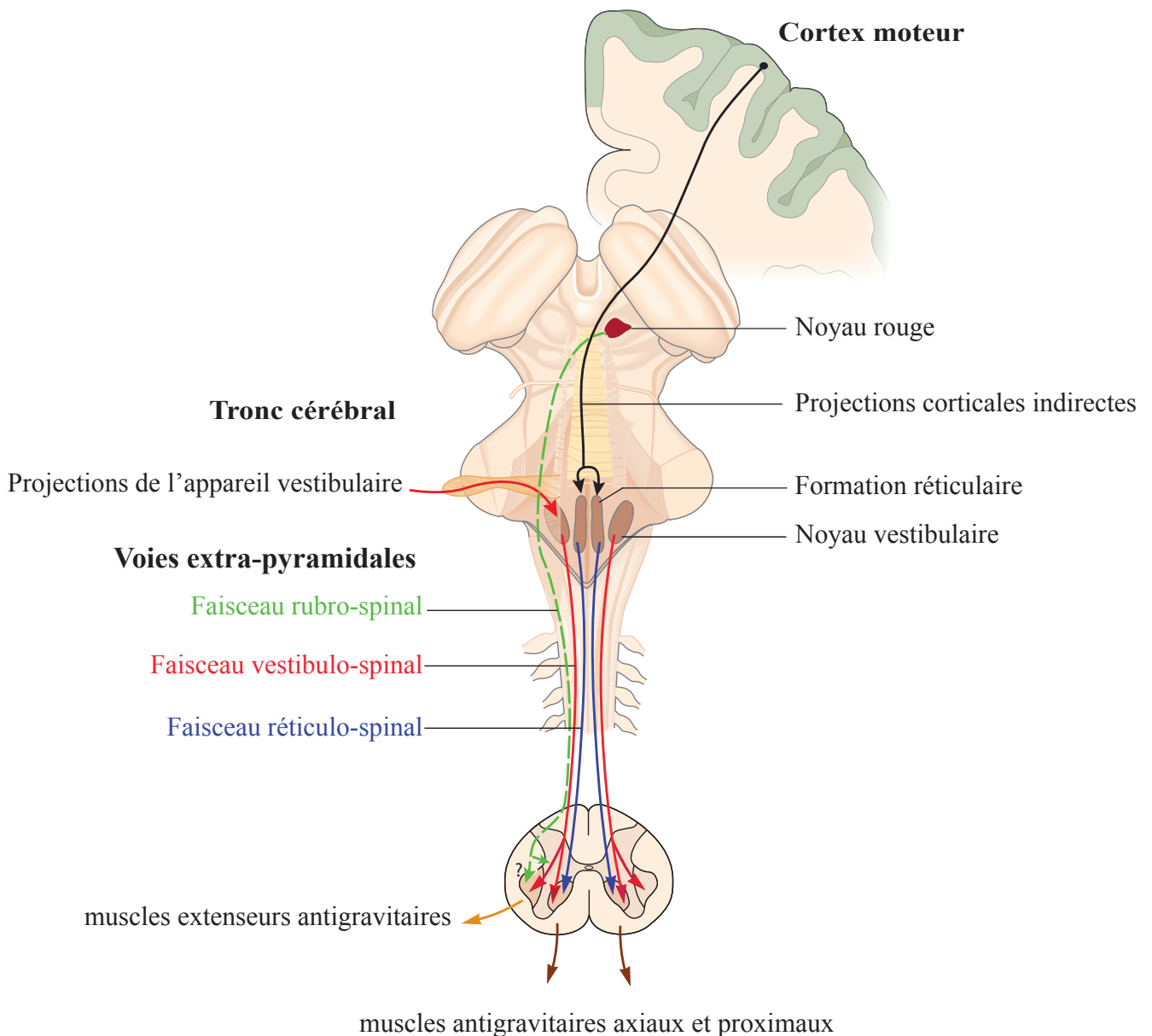


Figure 7. Principales voies extra-pyramidales impliquées dans le contrôle des mouvements

Les voies extra-pyramidales émanent de différents noyaux du tronc cérébral et reçoivent des projections en provenance des aires motrices et d'autres régions cérébrales. Les neurones du cortex moteur établissent des liens avec les neurones de la formation réticulaire qui permettent des ajustements posturaux. Le faisceau réticulo-spinal (bilatéral) projette essentiellement sur les parties centrales de la corne ventrale. Les neurones du noyau vestibulaire (bilatéral) reçoivent des messages sensoriels provenant des canaux semi-circulaires et des organes otolithiques situés dans l'oreille interne, puis les neurones du noyau vestibulaire projettent sur la corne ventrale centrale de la moelle épinière. Le faisceau vestibulo-spinal permet la régulation de la position de la tête. Le faisceau rubro-spinal prend son origine dans le noyau rouge qui chemine parallèlement au TCS dans le cordon controlatéral de la moelle épinière. Son existence chez l'homme adulte n'est pas certaine (adaptée de (Kandel *et al.*, 2012)).

Les voies réticulo-spinales ont deux origines : une origine bulbaire qui descend dans le cordon latéral et une origine pontique qui descend dans le cordon antérieur de la moelle épinière. Ces voies projettent également essentiellement sur la partie médiane de la corne ventrale de la moelle épinière où elles connectent essentiellement les interneurons qui coordonnent les muscles axiaux et proximaux, et à moindre mesure les MnS impliqués dans le contrôle de la musculature distale (Baker, 2011; Prentice & Drew, 2001; Riddle et al., 2009; Schepens & Drew, 2004).

Enfin, le tractus rubro-spinal (TRS), dont l'existence n'est pas certaine chez l'homme adulte (Nathan & Smith, 1982), est considéré comme une voie auxiliaire de la voie cortico-spinale pour le contrôle moteur. En effet il débiterait au niveau du noyau rouge magnocellulaire, croiserait la ligne médiane au niveau de la décussation pyramidale et suivrait un trajet parallèle au TCS (Murray & Haines, 1975). Cependant, chez l'homme, la taille du noyau rouge magnocellulaire est beaucoup plus importante chez le fœtus que chez l'adulte, où il n'est plus que vestigial (Onodera & Hicks, 2010). L'importance fonctionnelle du TRS chez l'homme reste à déterminer (Nathan & Smith, 1982). Chez les primates non humains et les autres mammifères, qui possèdent un noyau rouge plus développé, le TRS participe à la motricité des membres supérieurs (Ghez & Kubota, 1977; Gibson et al., 1985; Houk et al., 1988) et contribue à l'initiation de mouvements volontaires en parallèle du TCS (Ghez & Kubota, 1977). Chez le rongeur, les fibres rubro-spinales, qui suivent également le TCS, projettent principalement sur les interneurons des zones intermédiaires de la moelle épinière et, dans une plus faible proportion, directement sur les MnS qui innervent la musculature distale des membres supérieurs (Liang et al., 2012). Ces différences pourraient expliquer un rôle dominant du contrôle moteur cortical direct chez l'homme par rapport aux autres espèces.

## 5. Les motoneurones bulbaires et spinaux et l'activité motrice

Les MnBS et les neurones locaux (interneurones) sont les derniers composants du système moteur permettant la contraction musculaire. Dans les paragraphes suivants, seuls la moelle épinière et les MnS seront décrits, les mêmes caractéristiques étant applicables aux MnB.

### 5.1 La moelle épinière

Les MnS relayent l'information motrice reçue des centres supérieurs vers les muscles et sont considérés comme la voie finale commune de la motricité. Les interneurons locaux quant à eux sont impliqués dans la coordination réflexe des mouvements de par les projections des centres supérieurs et des afférences sensorielles qu'ils reçoivent (Kandel et al., 2012; Purves et al., 2011).

Ces interneurons spinaux sous contrôle du TCS restent encore mal connus. Chez le rongeur, la nature des interneurons connectant les NMCS aux MnS n'est pas clairement identifiée.

Des études ont cependant récemment montré que les interneurons ROR $\alpha$  (RAR-related orphan receptor alpha) serviraient de relai et de modulateur de l'information corticale, par connexion directe ou indirecte via les interneurons ventraux cholinergiques V0c, aux MnS (Bourane et al., 2015).

Des études de stimulation corticales menées chez le singe et l'homme ont montré qu'un seul NMCS innerve des MnS de différents muscles agonistes (divergence), pouvant ainsi influencer l'activité contractile de plusieurs muscles à la fois et permettre la coordination motrice (Datta & Stephens, 1990; McKiernan et al., 1998). D'autre part, elles ont montré que plusieurs NMCS projettent sur un MnS (convergence) (Kwan et al., 1978; Penfield & Boldrey, 1937; Schieber, 2007). Enfin, tous les MnS sont innervés par les NMCS excepté ceux innervant les muscles oculomoteurs et du sphincter ; ces derniers restent relativement épargnés dans la SLA (Iwatsubo et al., 1990).

## 5.2 Connexions nerveuses aux muscles squelettiques

Le système nerveux contrôle la contraction musculaire en envoyant des signaux du TCS vers les MnS qui relayent l'information aux fibres musculaires à l'origine du mouvement. L'exécution de la commande motrice par ces MnS dépend de leur niveau d'excitabilité, puisque ces MnS sont également régulés par des afférences sensorielles et des interneurons spinaux. En effet, les MnS sont les éléments post-synaptiques de boucles réflexes spinales excitatrices et inhibitrices.

Un muscle est contrôlé par une centaine de MnS. Chaque MnS innerve un ensemble de fibres musculaires d'un muscle et une fibre musculaire est innervée par un seul MnS. Le MnS unique et le groupe de fibres musculaires qu'il innerve correspondent à une unité motrice (Heckman & Enoka, 2012). L'ensemble des MnS innervant un muscle est regroupé en colonne sur plusieurs segments de la moelle épinière. Les MnS innervant les muscles posturaux du tronc se situent dans la partie médiane de la corne ventrale de la moelle épinière, tandis que ceux situés dans la partie latérale innervent les muscles distaux (Heckman & Enoka, 2012).

## 6. Modulation de l'activité motrice

Les aires corticales motrices ne sont pas les seules impliquées dans la commande et le contrôle des mouvements, il existe deux structures supplémentaires, le cervelet et les ganglions de la base, qui modulent l'information motrice par le biais de connexions réciproques avec le cortex cérébral, le tronc cérébral et/ou la moelle épinière (pour revue voir (Middleton & Strick, 2000)). Le cervelet reçoit et émet des projections vers le cortex cérébral, la moelle épinière et le tronc cérébral. Il intervient dans l'exécution de mouvements rapides et coordonnés (course, nage) et module les mouvements précis de posture et d'équilibre.

La fonction principale du cervelet est de comparer les signaux de commande (intention de mouvement) reçus par les centres supérieurs et les informations sensorielles (exécution effective du mouvement) reçues par le système nerveux périphérique, afin de détecter des erreurs. En cas d'erreur, le cervelet envoie des signaux correctifs au tronc cérébral et au cortex moteur par l'intermédiaire du thalamus (Kandel et al., 2012; Middleton & Strick, 2000; Purves et al., 2011).

Le système des ganglions de la base est composé de 5 noyaux : le striatum, qui comprend le noyau caudé et le putamen, le noyau sous-thalamique, et le pallidum qui comprend le globus pallidus et la substance noire. Il est organisé en boucle sous-corticale : allant des aires corticales via le striatum puis le pallidum et le thalamus pour retourner vers le cortex moteur. Cette boucle, active avant et pendant le mouvement, aide à la programmation des mouvements (Kandel et al., 2012; Middleton & Strick, 2000; Purves et al., 2011).

En conclusion, l'activité motrice volontaire est soumise à l'interaction de quatre sous-systèmes moteurs distincts : 1) les voies descendantes originaires des centres supérieurs, 2) les circuits locaux de la moelle épinière et du tronc cérébral, comprenant les interneurons locaux et les MnBS, 3) le cervelet et 4) les ganglions de la base (cf. Figure 1). Les TCS et TCB et les MnBS constituent la voie directe de la motricité et sont indispensables pour la réalisation de mouvements fins et individualisés. Les voies extra-pyramidales permettent quant à elles un ajustement de la posture, la locomotion et la motricité orofaciale. Enfin, l'exécution des mouvements est régulée par l'activité du cervelet et des ganglions de la base. C'est donc l'interaction de ces quatre centres nerveux qui permet la réalisation de mouvements volontaires adaptés.

Parmi les diverses populations neuronales qui composent le système moteur, la dégénérescence combinée de deux d'entre elles, les NMCS et les MnBS est à l'origine d'une maladie fatale, la SLA (voir chapitre 3 de l'introduction : « La sclérose latérale amyotrophique »). Les recherches précliniques menées sur la SLA ont permis de mieux comprendre comment les MnBS dégénèrent au cours de la SLA. En revanche, les NMCS ont été particulièrement ignorés des recherches précliniques, et ce, malgré un nombre grandissant d'évidences suggérant un rôle prépondérant du cortex cérébral chez les patients SLA (pour revue, voir (Eisen et al., 2017; Geevasinga et al., 2016)) (voir chapitre 4 : « Place du cortex cérébral et des Neurones Moteurs Cortico-Spinaux dans la recherche sur la SLA »).

Mon travail de thèse a consisté à mieux comprendre la dynamique spatio-temporelle de la dégénérescence des NMCS au cours de la SLA, et à mettre en évidence les mécanismes qui la régissent. Le chapitre suivant est consacré à une présentation plus précise de cette population neuronale (chapitre 2 : « les Neurones Moteurs Cortico-Spinaux »).



Chapitre II.

## **Les Neurones Moteurs Cortico-Spinaux**

Les grands principes de l'organisation du cortex cérébral et de son développement sont conservés chez les mammifères, notamment des rongeurs jusqu'aux primates. Les études menées chez la souris ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les étapes majeures du développement cortical, d'identifier les différentes sources de neurones corticaux, et d'identifier les gènes qui contrôlent leur migration et leur spécification (Allendoerfer & Shatz, 1994; McConnell, 1991; Mione et al., 1997; Molyneaux et al., 2007). Plus d'une centaine de types cellulaires distincts de neurones corticaux excitateurs et inhibiteurs sont produits et constituent le cortex cérébral. Parmi eux se trouvent les NMCS de la couche V du cortex cérébral connectant le cerveau à la moelle épinière. Cette population neuronale indispensable à la réalisation de mouvements volontaires est atteinte dans certaines maladies neurodégénératives telles que la SLA.

### 1. Genèse et spécification moléculaire

Après formation du tube neural, les vésicules télencéphaliques donnent naissance au cortex, depuis le toit (partie dorsale), et aux éminences ganglionnaires depuis le plancher (partie ventrale). Les neurones corticaux proviennent de la zone ventriculaire de ces deux parties, lieu de la neurogenèse, située le long des ventricules latéraux (Anderson et al., 2002; Kowalczyk et al., 2009; Noctor et al., 2004).

Les interneurons corticaux inhibiteurs émanent de la zone ventriculaire ventrale, et migrent d'abord tangentiellement puis radialement pour aller peupler le cortex cérébral (Anderson et al., 2001, 2002).

Les neurones corticaux excitateurs sont générés, quant à eux, à partir de la zone ventriculaire dorsale, et migrent radialement vers le cortex (Anderson et al., 2002; Kowalczyk et al., 2009; Mione et al., 1997; Noctor et al., 2004; Rakic, 1988). De manière successive, les nouveaux neurones excitateurs générés migrent au-delà des précédents, et viennent se positionner en superficie du cortex en développement (Allendoerfer & Shatz, 1994; McConnell, 1991), pour constituer les six couches corticales. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, outre leur date de naissance, ces couches se différencient par la nature de leurs populations de neurones corticaux excitateurs qui se distinguent par les cibles qu'ils innervent et leurs marqueurs moléculaires. Ainsi, la couche VI comprend les neurones cortico-thalamiques, la couche V les neurones de projection sous-cérébrale, dont les NMCS, la couche IV des neurones de projection locale, et les couches II/III des neurones cortico-corticaux. La couche I ne comprend pas de neurones corticaux excitateurs. Parmi les neurones de la couche V, on distingue, selon les aires corticales, les neurones cortico-tectaux, situés dans le cortex visuel et projetant vers le colliculus supérieur et le pont ; les neurones cortico-pontiques projetant vers le pont ; et les NMCS situés dans le cortex moteur et sensorimoteur (Molyneaux et al., 2007; Oswald et al., 2013). Ces neurones de projection sous-cérébrale sont

générés au jour embryonnaire 13,5 (E13,5) chez la souris (Molyneaux et al., 2007; Takahashi et al., 1999), E15 à E16 chez le rat (Bayer et al., 1991), et entre la 10<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme.

Les neurones corticaux excitateurs acquièrent une identité laminaire au moment de leur division mitotique terminale (Allendoerfer & Shatz, 1994; Molyneaux et al., 2007). La spécification progressive des couches corticales dépend de l'expression de combinaisons de gènes. Ainsi, les NMCS expriment les gènes *Fezf2* (Fez family zinc finger 2), *Sox5* (SRY-box 5) et *Bcl11b* (B-cell leukaemia/lymphoma 11B), comme les autres neurones excitateurs des couches profondes (V et VI); les gènes *Crym* (Crystallin Mu), *Crim1* (cystein-rich motor neuron 1), *Clim1* (LIM domain binding protein), *Diap3* (diaphanous homolog 3) et *S100a10* (S100 calcium binding A10) comme ceux de la couche V expriment ; et le gène *Bhlhb5* (Basic Helix-Loop-Helix Domain Containing, Class B, 5) comme les neurones excitateurs des couches II/III et V (Arlotta et al., 2005; Molyneaux et al., 2007). Les NMCS partagent, par conséquent, des marqueurs moléculaires avec plusieurs sous-types de neurones excitateurs de différentes couches corticales. À l'heure actuelle, aucun marqueur moléculaire spécifique des NMCS n'a pu être identifié. Cependant, parmi les différents gènes exprimés par les NMCS et autres neurones de la couche V, le gène *Fezf2*, qui code pour un facteur de transcription, joue un rôle clé dans leur spécification (Chen et al., 2005; Molyneaux et al., 2005). En effet, des études de perte de fonction *in vivo* chez la souris montrent que *Fezf2* est nécessaire à la spécification de tous les neurones de projection sous-cérébrale, y compris les NMCS (Chen et al., 2005; Molyneaux et al., 2005). De plus, les souris présentant une invalidation complète du gène (*knock-out*, KO) se développent en l'absence de neurones de projection sous-cérébrale et de NMCS en particulier, et donc en absence de connexion directe entre le cortex cérébral et la moelle épinière (Molyneaux et al., 2005). Le gène *Fezf2* est par ailleurs suffisant pour instruire la spécification de neurones de couches corticales profondes V et VI, et de NMCS. En effet, sa surexpression dans les progéniteurs corticaux du cortex cérébral (Molyneaux et al., 2005), du striatum (Rouaux & Arlotta, 2010) ou encore dans de jeunes neurones corticaux post-mitotiques d'une autre lignée (Rouaux & Arlotta, 2013) est suffisante pour programmer ou reprogrammer ces populations cellulaires en neurones corticofuges, et notamment en NMCS. Dans l'ensemble ces données montrent que *Fezf2* est nécessaire et suffisant pour la spécification des NMCS et l'établissement des connexions cortico-spinales.

D'autres gènes sont, quant à eux, importants pour le développement des NMCS, tels que *Bcl11b*, ou *EphB1*, impliqués dans l'extension de leur axone vers la moelle épinière (Arlotta et al., 2005; Lodato et al., 2014).

## 2. Caractérisation morphologique et anatomique

Les NMCS possèdent les plus gros corps cellulaires du cortex cérébral. De ce corps cellulaire naît : 1) une large dendrite apicale qui s'étend à la couche I et qui présente des ramifications majeures, en particulier dans les couches II / III, 2) de nombreuses dendrites basales et 3) un très long axone s'étendant vers la moelle épinière (Molnar & Cheung, 2006; Molyneaux et al., 2007; Özdinler & Macklis, 2006) (Figure 8A). Ils émettent également des collatérales secondaires vers le striatum, le noyau rouge et le pont (Shepherd, 2011).

Chez les rongeurs, au cours de leur migration radiale initiale, les NMCS subissent plusieurs modifications morphologiques, en commençant par l'adoption d'une forme pyramidale, suivie d'une spécification et d'une croissance axonale (pour revue, voir (Canty & Murphy, 2008)). Les axones des NMCS descendent au sein du cortex et sont dirigés latéralement dans la substance blanche sous-jacente pour entrer dans la capsule interne et emprunter le TCS. Chez la souris, ils atteignent les niveaux supérieurs du tronc cérébral à E17 (17<sup>ème</sup> jour embryonnaire), le pont à E18.5, et entrent dans la moelle épinière à P0 (jour postnatal 0) (de Kort et al., 1985; Jones et al., 1982). Les premiers axones atteignent le bas de la région cervicale à P2, de la région thoracique à P7, et de la région lombaire à P9 (Gianino et al., 1999). Les NMCS établissent des contacts synaptiques principalement avec les interneurons de la corne dorsale de la moelle épinière, qui innervent à leur tour les MnS. Ces contacts synaptiques se mettent en place après que les connexions entre les interneurons et les MnS, ainsi que celles des MnS avec les muscles striés squelettiques aient été établies (Kamiyama et al., 2006). À P14, toutes les cibles de la moelle épinière, même les plus caudales, sont innervées. Les connectivités sont alors progressivement affinées au cours des semaines suivantes (Hsu et al., 2006).

La population des NMCS peut être subdivisée en sous-populations selon le segment et les cibles de la moelle épinière qu'ils innervent (Akintunde & Buxton, 1992a, 1992b; Kamiyama et al., 2015; Olivares-Moreno et al., 2017). Chez le rongeur, des études basées sur le marquage rétrograde des NMCS depuis la moelle épinière ont montré que contrairement à la population totale de NMCS, qui s'étend des aires rostrales aux aires caudales du cortex (M1, M2, S1, S2), les NMCS à projection lombaires sont restreints aux mêmes régions caudales sensori-motrices du cortex (S1 et M1) (Kamiyama et al., 2015; Olivares-Moreno et al., 2017). De plus, des différences morphologiques semblent exister parmi les NMCS. En effet, il a été montré que les NMCS à projection lombaire présentent un soma et une arborisation dendritique plus larges (Oswald et al., 2013).

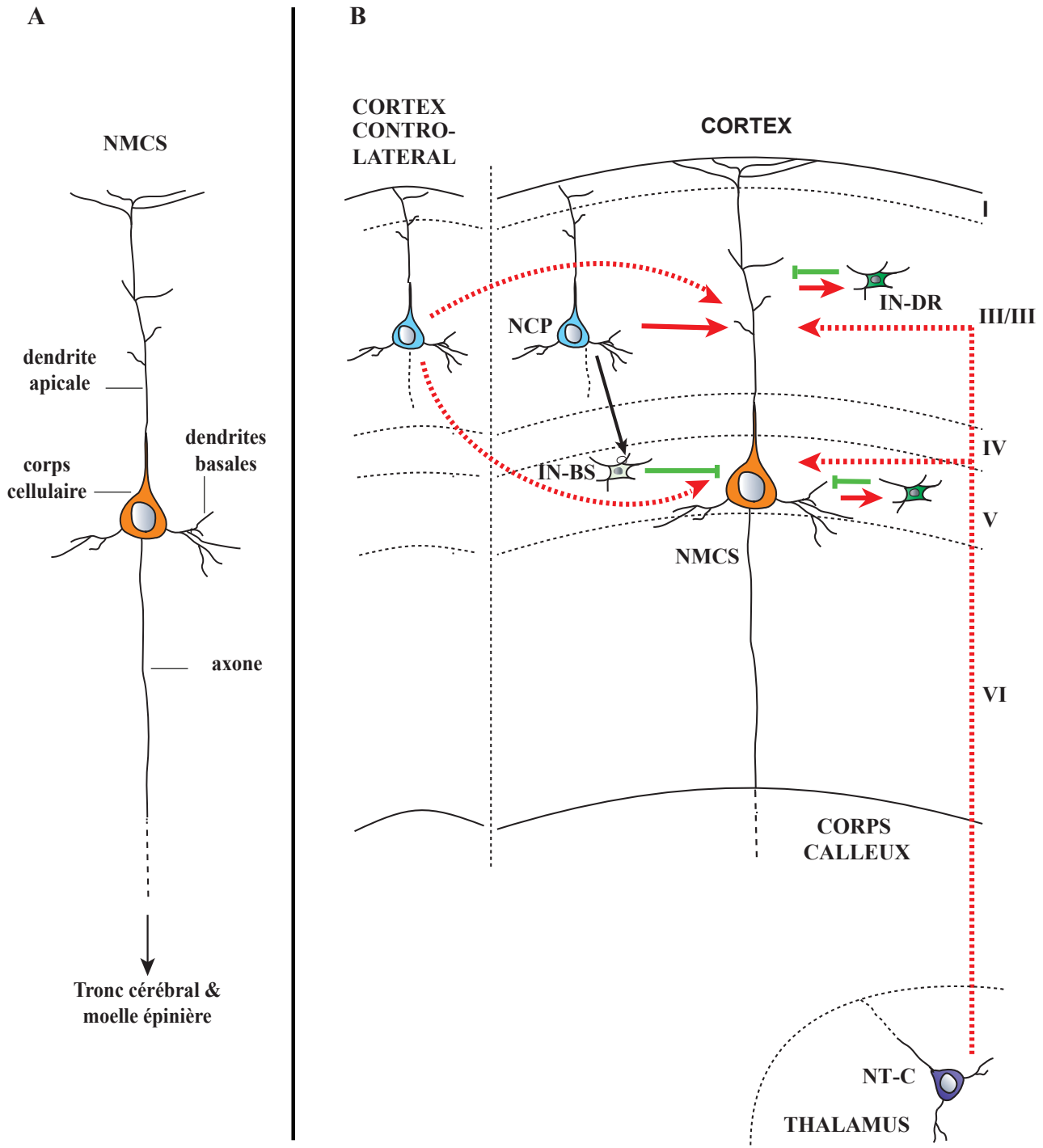


Figure 8. **Morphologie des Neurones moteurs cortico-spinaux et modulation de leur activité.**

**A.** Représentation schématique d'un neurone moteur cortico-spinal (NMCS). **B.** Les NMCS sont activés localement (flèches rouges pleines) ou à distance (flèches rouges pointillées) par les neurones calleux de projection (NCP) (en ipsi- et contralatéral) et les neurones thalamo-corticaux (NT-C). L'inhibition est réalisée localement (flèches pleines vertes) par des interneurons à bas seuil (IN-BS) (tels que ceux exprimant la somatostatine) et des interneurons à décharge rapide (IN-DR) (tels que ceux exprimant la parvalbumine).

En outre, Olivares-Moreno et ses collègues (2017) ont montré chez le rat qu'au sein d'un même segment de la moelle épinière, les projections émanant des NMCS se répartissent entre la corne dorsale et la zone intermédiaire, activant ainsi différentes populations d'interneurones spinaux. Les NMCS qui projettent dans la corne dorsale cervicale se situeraient dans la partie supérieure de la couche Vb, tandis que les NMCS projetant dans la zone intermédiaire cervicale se situeraient dans la partie inférieure de la couche de Vb. Ceci suggère une organisation fonctionnelle des NMCS au sein de la couche Vb, avec l'existence de sous-types de NMCS permettant le contrôle de différents circuits locaux spinaux impliqués dans différents aspects de la motricité (Olivares-Moreno et al., 2017).

Ainsi, ces études suggèrent l'existence de sous-populations neuronales basée notamment sur leur site de projection et de différences phénotypiques distinctes entre certaines d'entre-elles, telles que les NMCS à projection lombaire.

### 3. Fonction et modulation

Les NMCS ont une capacité unique à recueillir, intégrer, traiter les informations excitatrices et inhibitrices corticales et à les transmettre sous forme de messages excitateurs. Cette capacité leur confère un rôle essentiel pour l'initiation et la modulation du mouvement volontaire nécessitant une commande corticale (Lemon, 2008). La fonction des NMCS est modulée par des afférences synaptiques excitatrices et inhibitrices de deux types : *proximales* en provenance de neurones voisins ; *distales* en provenance de neurones d'autres aires ou couches corticales, appelés neurones de projection (Shepherd, 2011) (Figure 8B).

#### 3.1 Modulations excitatrices

D'après des études anatomiques du cortex, les NMCS sont régulés positivement via les NCP situés des couches II/III et V (Shepherd, 2011; Thomson & Lamy, 2007). Les NMCS reçoivent des entrées excitatrices provenant du thalamus, via les neurones thalamo-corticaux, qui transmettent des informations cognitives et sensorielles par l'intermédiaire de réseaux neuronaux impliquant notamment le cervelet et les ganglions de la base (Clascá et al., 2012) (Figure 8B). De plus, au sein de la couche V, les NMCS reçoivent également des afférences excitatrices provenant de collatérales de neurones cortico-striataux et interagissent également entre eux, ce qui suggère l'existence de possibles boucles de contrôles positifs et négatifs (Kiritani et al., 2012; Shepherd, 2011, 2013).

### 3.2 Modulations inhibitrices

Les NMCS sont régulés négativement par le biais d'entrées inhibitrices de deux sous-types d'interneurones : les interneurones à décharge rapide (tels que les interneurones exprimant la PV), et les interneurones à bas seuil (tels que les interneurones exprimant la SST) (Tanaka et al., 2011). Des études récentes ont montré que ces deux types d'interneurones inhibent différemment les NMCS (Apicella et al., 2012). Les interneurones à bas seuil inhibent les NMCS après activation par les neurones excitateurs de la couche II/III au niveau des arborisations et des épines dendritiques (Rudy et al., 2011). Les interneurones à décharge rapide, quant à eux connectés réciproquement aux NMCS, inhibent ces derniers selon une boucle de rétrocontrôle. Ces interneurones constitueraient la principale source d'inhibition locale (Apicella et al., 2012; Tanaka et al., 2011) (Figure 8B). Un élément important à souligner, les interneurones PV à décharge rapide, qui constituent la principale inhibition des NMCS dégénèrent chez les patients SLA (Nihei et al., 1993).

La modulation de la fonction des NMCS par une balance appropriée entre ces afférences excitatrices et inhibitrices est primordiale pour l'intégration et la transmission des informations motrices adéquates. En outre, l'intégrité de la connectivité et de la communication entre le cerveau et la moelle épinière est quant à elle primordiale pour le relai, sur de longues distances, de ces informations et l'établissement d'un mouvement volontaire normal. Ainsi, toute atteinte du TCS et des NMCS, en particulier chez l'homme, conduit à une grande altération de la connexion entre le cortex cérébral et la moelle épinière et à de nombreuses atteintes motrices (Hains et al., 2003; Schieber, 2007).

## 4. Maladies des neurones moteurs impliquant les Neurones Moteurs Cortico-Spinaux

Du fait de leur place primordiale dans le circuit neuronal moteur, les NMCS sont cliniquement pertinents. En effet, au vu de la surface corticale importante qu'occupent les aires motrices et de la longueur du trajet de ces voies motrices jusqu'à la moelle épinière (pouvant atteindre plus d'un mètre chez l'homme), leurs lésions ne sont pas rares, et peuvent entraîner de graves conséquences motrices. Par exemple, l'intégrité et la connectivité des NMCS sont affectées par les lésions de la moelle épinière qui induit la dégénérescence progressive des NMCS, la perte de connexion entre le cerveau et la moelle épinière, et une paralysie à long terme (Hains et al., 2003; Lemon, 2008). Les lésions du TCS entraînent par ailleurs une détérioration de la vitesse, de la force et de la coordination des mouvements (Lemon, 2008). Les NMCS peuvent également être affectés par la neurodégénérescence. En effet, leur dysfonctionnement et leur perte sont reconnus dans la SLA, la sclérose latérale primaire (SLP) et la paraplégie spastique héréditaire (PSH). À l'inverse,

d'autres maladies neurodégénératives du motoneurone semblent ne pas affecter les NMCS ; c'est le cas de la maladie de Kennedy (Hirota et al., 2000; Sobue et al., 1989).

### **4.1 Caractéristiques cliniques de l'atteinte des NMCS**

La dégénérescence des NMCS ou toute lésion le long du TCS s'accompagne d'un ensemble de symptômes que l'on désigne sous le nom de syndrome pyramidal. Les signes cliniques observés diffèrent nettement de ceux observés pour l'atteinte des MnBS et comprennent un ensemble de déficits moteurs caractéristiques (Figure 9).

L'atteinte des MnBS a pour conséquence une diminution de la force musculaire (parésie), ou dans les cas plus sévères, une perte du mouvement (paralysie) des muscles concernés. Parmi les signes cliniques, se trouve une disparition des réflexes, appelée aréflexie, due à l'interruption de la branche efférente motrice des circuits spinaux réflexes et une abolition du tonus musculaire. À ces premiers symptômes s'ajoute plus tardivement une atrophie des muscles affectés due à la dénervation progressive et à l'absence de leur utilisation. Il est possible également d'observer des fibrillations ou des fasciculations musculaires. Les fasciculations sont des contractions spontanées dans les unités motrices, résultat d'une activité anormale des MnBS affectés. Les fibrillations correspondent à des contractions spontanées dans les fibres musculaires et sont le résultat des modifications de l'excitabilité de ces fibres dénervées (Purves et al., 2011; Sathasivam, 2010) (Figure 9).

L'atteinte des NMCS provoque le signe de Babinski, correspondant à une réponse plantaire en extension lorsque l'on gratte la plante du pied. À cela s'ajoute la spasticité correspondant à une augmentation exagérée du tonus musculaire, une hyperréflexie qui se traduit par un réflexe myotatique exagéré et une hypertonie correspondant à une exagération des contractions musculaires associées à une faiblesse dans l'exécution des mouvements. Il est également observé une perte de la capacité d'exécuter des mouvements fins résultant de lésions des fibres cortico-spinales contrôlant les MnBS (Purves et al., 2011; Sathasivam, 2010) (Figure 9).

### **4.2 Maladies du neurone moteur associées à l'atteinte des Neurones Moteurs Cortico-Spinaux**

La dégénérescence des NMCS et des MnBS conduit à des maladies neurologiques pouvant être regroupées en trois catégories selon les neurones moteurs affectés : 1) celles touchant majoritairement les NMCS, comme c'est le cas pour la PSH et la SLP ; 2) celles touchant principalement les MnBS, englobant l'atrophie musculaire spinale (AMS), l'atrophie musculaire progressive (AMP) et la maladie de Kennedy ; et 3) celle affectant aussi bien les NMCS que les MnBS, la SLA. Ces maladies sont regroupées sous le terme de Maladie du Neurone Moteur (MND, *Motor Neuron Disease*) (Swash & Desai, 2000).



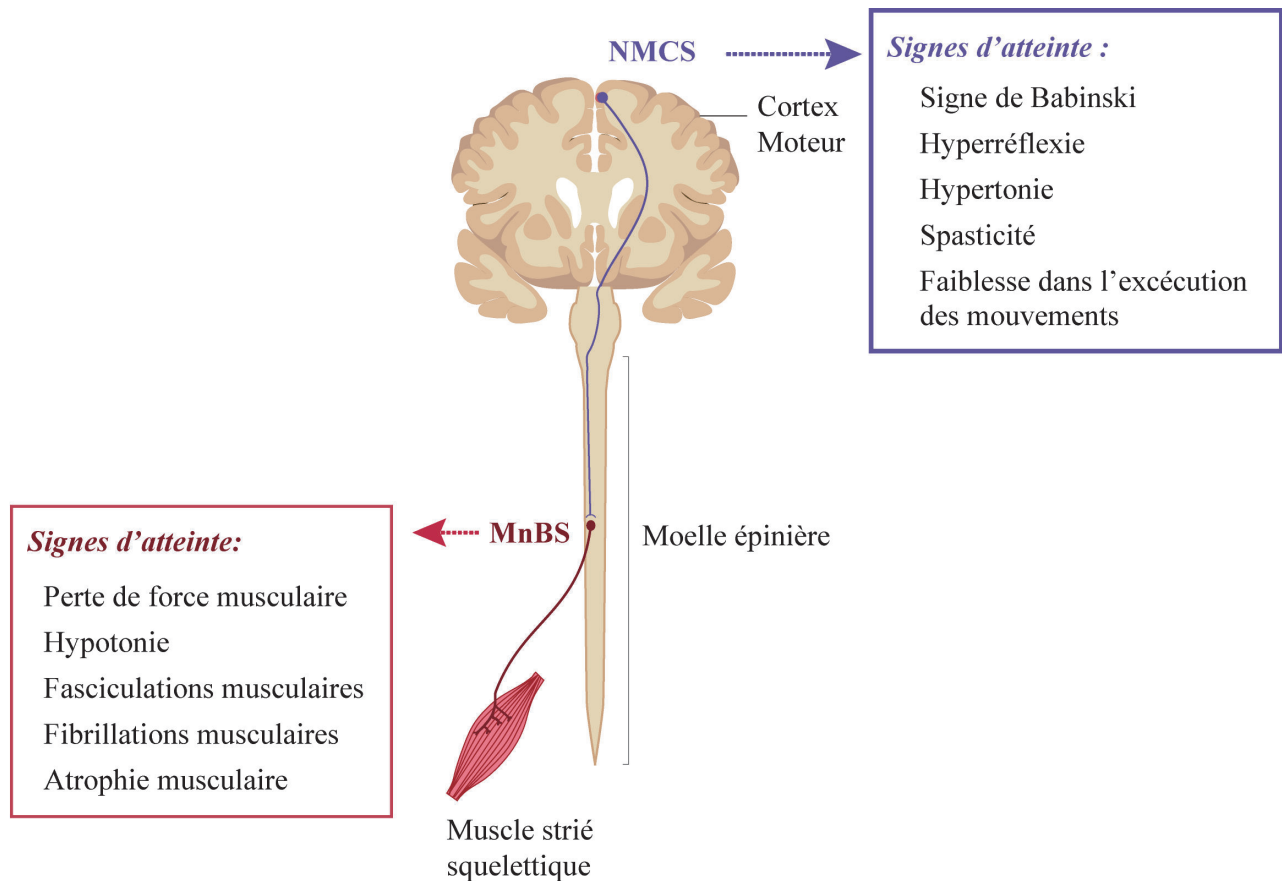


Figure 9. **Signes cliniques de la dégénérescence des NMCS et des MnBS.**

La dégénérescence des NMCS se traduit cliniquement par une hyperréflexie, une hypertonie, une spasticité, la présence du signe de Babinski ainsi qu'une faiblesse dans l'exécution des mouvements. En revanche, les signes de la dégénérescence des MnBS incluent une perte de la force musculaire, une aréflexie, une hypotonie, des fibrillations, des fasciculations conduisant progressivement à une atrophie et une paralysie des muscles striés squelettiques (adaptée de (Taylor et al., 2016)).

Les maladies du neurone moteur se définissent ainsi comme un groupe de maladies neurologiques cliniquement et pathologiquement hétérogènes, d'origines sporadiques ou héréditaires (Dion et al., 2009), dont la SLA est la forme la plus courante.

Ainsi, la SLA, qui fait l'objet de la troisième partie de l'introduction, sera ici présentée succinctement avec les deux autres maladies des neurones moteurs avec qui elle partage les caractéristiques cliniques de l'atteinte des NMCS : la SLP et la PSH (Brown & Robberecht, 2001; Cervenakova et al., 2000; Fink, 2001, 2013; Robberecht & Philips, 2013; Udaka et al., 1986) (Tableau 1).

### 4.2.1 Sclérose Latérale Amyotrophique

La SLA est une maladie neurodégénérative progressive débutant entre 50 et 60 ans. Elle se caractérise par la perte des NMCS et des MnBS entraînant les signes cliniques cités précédemment (spasticité, hyperréflexie, signe de Babinski, fasciculations, faiblesse musculaire) qui conduit à une paralysie musculaire progressive et une insuffisance respiratoire engageant le pronostic vital. La SLA reste encore aujourd'hui incurable et présente un pronostic extrêmement sévère conduisant au décès des patients 2 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes (Kiernan et al., 2011) (Tableau 1).

Ainsi, d'un point de vue clinique, l'atteinte conjointe des NMCS et des MnB ou MnS est nécessaire au diagnostic de la SLA et permet de la différencier de pathologies moins sévères telles que celles affectant strictement les NMCS, la SLP et la PSH (Brooks, 1994; Brooks et al., 2000; Mitchell, 2000). Néanmoins, la présentation clinique de la SLA peut varier en fonction de la prédominance de l'atteinte des NMCS ou des MnBS. Une prédominance de l'atteinte des NMCS peut ainsi rendre difficile la distinction clinique des trois maladies (D'amico et al., 2013). Au-delà du diagnostic, il apparaît intéressant de comprendre pourquoi ces maladies conduisent à des pathologies distinctes alors qu'elles présentent toutes une atteinte des NMCS.

### 4.2.2 Sclérose Latérale Primaire

La SLP est une maladie sporadique rare, représentant environ 5% des cas de maladie du motoneurone (D'amico et al., 2013; Singer et al., 2007). Elle débute entre 35 et 66 ans et se caractérise par un dysfonctionnement de la fonction des NMCS en absence de signes cliniques d'atteinte des MnBS et d'antécédents familiaux suggérant une PSH (Tableau 1).

Bien que la SLP soit considérée comme une maladie sporadique, une mutation du gène de l'alsine (*ALS2*) a été retrouvée dans des cas de SLP juvéniles autosomiques récessifs (Yang et al., 2001) et des mutations du gène *C9ORF72* (*chromosome 9 open reading frame 72*) dans une minorité de patients SLP (Mitsumoto et al., 2015). De façon intéressante, ces mutations sont également retrouvées dans la majorité des cas familiaux de SLA (Praline et al., 2010).

**Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques de la SLA, de la SLP et de la PSH**

| Maladie    | Age de début (ans) | Issue de la maladie | Transmission familiale        | Neurones moteurs touchés | Caractéristiques cliniques (formes pures)  |
|------------|--------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------|--|
| <b>SLA</b> | 50-60              | 2 à 5 ans           | Inconnue                      | NMCS et MnBS             | Hyperreflexie<br>Hypertonie<br>Signe de Babinski<br>Spasticité<br>Atrophie musculaire<br>Fasciculations<br>Fibrillations<br>Faiblesse puis paralysie musculaire<br>Insuffisance respiratoire |
| <b>SLP</b> | 35-66              | Décennies           | AD, AR ou lié au chromosome X | NMCS                     | Spasticité progressive<br>Hyperreflexie  |
| <b>PSH</b> | Enfance-70         | Décennies           | 10 %                          | NMCS                     | Spasticité progressive des membres inférieurs<br>Faiblesse des membres inférieurs  |

Sclérose latérale amyotrophique (SLA), sclérose latérale primaire (SLP), paralysie spastique héréditaire (PSH) (adapté de (Strong & Gordon, 2005)). Autosomique dominante (AD), autosomique récessive (AR)

La distinction entre la SLP et la SLA est basée sur l'absence d'implication des MnBS dans la SLP (Gordon et al., 2009). Cependant, il existe une controverse quant à savoir si la SLP est une pathologie distincte ou une variante de la SLA. En effet, certains patients progressent avec le temps vers une SLA typique avec une atteinte des MnBS. Ainsi, cliniquement, la SLP est diagnostiquée avec certitude au moins 4 ans (voir plus) après l'apparition de symptômes (Gordon et al., 2006). La SLP présente un pronostic plus bénin que la SLA. Elle se caractérise par une progression plus lente, un maintien de la fonction motrice plus longue, une diminution de la fonction respiratoire et une perte de poids moins sévères avec une survie beaucoup plus longue que les patients atteints de SLA (Gordon et al., 2009; Strong, 2001). Les caractéristiques cliniques les plus communément retrouvées incluent une spasticité et une hyperréflexie, avec une absence de fasciculation et d'atrophie musculaire (Tableau 1). Une proportion très élevée de patients atteints de SLP commence par une atteinte des membres inférieurs, avec un début de démarche spastique, puis progresse vers les membres supérieurs.

Après des années de progression lente, la SLP semble se stabiliser sur une durée assez variable, allant de 7 à 14 ans. Bien que chez certains patients les déficits neurologiques restent modestes, d'autres patients développent une quadriplégie sévère et une paralysie spastique bulbaire (Singer et al., 2007).

Le diagnostic de la SLP inclut une imagerie cérébrale sans anormalité structurale, à l'exception de l'atrophie du gyrus précentral (Pringle et al., 1992; Singer et al., 2007). Une atrophie de la substance blanche sous-jacente ainsi qu'une réduction de l'épaisseur du cortex moteur sont également identifiées (Butman & Floeter, 2007; Pringle et al., 1992). Une diminution de la quantité de N-acétylaspartate est observée (Chan et al., 2003; Zhai et al., 2003). La dégénérescence du TCS est détectée et semble plus restreinte que celle observée chez les patients atteints de SLA (Uluğ et al., 2004). De plus, une diminution de l'excitabilité du cortex moteur est observée contrairement aux patients SLA (Geevasinga, Menon, Sue, et al., 2015; Zhai et al., 2003).

Peu d'analyses post-mortem ont été effectuées chez les patients atteints de SLP. Ces autopsies ont permis d'identifier des caractéristiques communes à tous les patients : une dégénérescence du TCS, une diminution ou une absence de NMCS et une atrophie du gyrus précentral. Cependant, la plupart de ces analyses ont décrit des cas de SLP compliqués, pouvant présenter une atrophie fronto-temporale, être associés à des démences et présentant des corps de Bunina ou des inclusions ubiquitinyliées (Singer et al., 2007). Malgré tout, ces rapports d'autopsies, bien que peu nombreux, révèlent la complexité et l'étendue du spectre des symptômes et des altérations pathologiques sous-jacents des patients diagnostiqués comme ayant une atteinte des NMCS. Ils suggèrent également que la SLP pourrait être une variante de la SLA, puisqu'une atteinte des MnBS est souvent observée lors de l'autopsie (D'amico et al., 2013) et que certaines

mutations, telles que celle du gène alsine (*ALS2*), ont été identifiées dans ces deux pathologies (Renton et al., 2014; Saberi et al., 2015; Swinnen & Robberecht, 2014; Yang et al., 2001).

### 4.2.3 Paraplégie Spastique Héritaire

La PSH désigne un ensemble de maladies neurodégénératives héréditaires, génétiquement hétérogènes, caractérisées par une spasticité progressive et une faiblesse restreintes aux membres inférieurs, causée par la dégénérescence progressive des NMCS (pour revue, voir (Fink, 2013; Harding, 1993)).

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif, mais plusieurs médicaments sont disponibles pour atténuer certains des symptômes, tels que la spasticité (Fink, 2013). La PSH peut débuter entre l'enfance et 70 ans et être héritée de façon autosomique dominante, autosomique récessive ou via le chromosome X. Elle est traditionnellement divisée en PSH « pure », caractérisée par une atteinte neurologique limitée à la faiblesse spastique des extrémités inférieures, et PSH « compliquée » lorsque d'autres caractéristiques neurologiques (telles que la démence, l'ataxie) sont également observées (Fink, 2013), en plus de la paraplégie spastique (Tableau 1).

L'hétérogénéité clinique de la PSH est liée à l'hétérogénéité génétique observée avec environ 70 gènes identifiés à ce jour. Environ 40% des PSH autosomiques dominantes sont dues à des mutations du gène *SPG4*, codant pour la spastine, une protéine possédant des propriétés de désassemblage des microtubules (Blackstone, 2012). Les mutations dans le gène *SPG3A* (atlastine-1) représentent environ 10% des PSH autosomiques dominantes et sont la deuxième cause de PSH (Namekawa et al., 2006). L'atlastine-1 est une GTPase importante pour la formation du réticulum endoplasmique (RE) tubulaire où elle interagit également avec la spastine (Blackstone, 2012). Par ailleurs, des mutations du gène *SPG11* (spatacsine) sont responsables d'environ 21% des cas autosomiques récessifs et conduisent à une troncature de la protéine. De façon intéressante, ces mutations sont retrouvées dans les formes juvéniles de SLA (Orlacchio et al., 2010; Stevanin et al., 2008). Des mutations dans *SPG8* (strumpelline) ont également été rapportées dans la SLP. Elles représentent environ 4% des PSH et sont héritées de façon autosomique dominante (Valdmanis et al., 2007). D'autres gènes associés à la PSH moins fréquents sont *SPG42* (*SLC33A1*), *SPG39* (*PNPLA6*), *SPG53* (*VPS37A*), *SPG46* (*GBA2*) et *SPG43* (*C19ORF12*) (Fink, 2013; Landouré et al., 2013; Martin et al., 2012; Yoon et al., 2013). Les connaissances sur la base génétique de ces maladies se développent ainsi rapidement (Dion et al., 2009; Finsterer et al., 2012) et soutiennent un lien génétique étroit entre la PSH et d'autres maladies neurodégénératives. Une étude récente de séquençage d'exomes des patients atteints de PSH a révélé des voies moléculaires communes avec la SLA ainsi que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Novarino et al., 2014).

Les protéines affectées dans la PSH entraînent notamment un dysfonctionnement du transport axonal, une perturbation de la morphologie du RE, un dysfonctionnement mitochondrial, une perturbation du métabolisme lipidique, ainsi qu'une anomalie de la myéline (Blackstone, 2012; Salinas et al., 2008). Certaines de ces altérations sont retrouvées dans la SLA telles que : l'altération du transport axonal et de l'organisation des microtubules (Al-Chalabi et al., 1999; Corrado et al., 2011), le dysfonctionnement de la dynamique endosomale (Blackstone, 2012; Chen et al., 2012), le dysfonctionnement mitochondrial (Blackstone, 2012; Cozzolino et al., 2008; Cozzolino & Carri, 2012), l'altération du métabolisme lipidique (Blackstone, 2012; Cutler et al., 2002; Henriques, Kastner, et al., 2015; Palamiuc et al., 2015), et le dysfonctionnement et stress du RE (Blackstone, 2012; Matus et al., 2013) (Figure 10).

Les examens neurologiques montrent une faiblesse et une spasticité des membres inférieurs. Une hyperréflexie et le signe de Babinski sont également observés (Fink, 2014; Harding, 1993; Hedera et al., 2005). L'une des anomalies les plus fréquemment observées par imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'amincissement de la moelle épinière cervicale et thoracique (Hedera et al., 2005; Krabbe et al., 1997; Salinas et al., 2008). De plus, une diminution de l'excitabilité des régions du M1 associées aux membres inférieurs est observée par stimulation magnétique transcrânienne (SMT) (Sartucci et al., 2007).

Les analyses post-mortem de patients atteints de PSH, bien que peu nombreuses, révèlent peu ou pas de perte des cellules de Betz contrairement aux patients SLA et SLP (McDermott et al., 2000; Salinas et al., 2008; Schwarz & Liu, 1956). Elles montrent, néanmoins, une dégénérescence axonale du TCS plus sévère aux extrémités distales des axones des NMCS projetant vers la moelle épinière thoracique et cervicale (Salinas et al., 2008; Schwarz & Liu, 1956). Dans certains cas, cette dégénérescence peut s'étendre vers le pont, les pédoncules cérébraux et la capsule interne (McDermott et al., 2000; Schwarz & Liu, 1956). Du fait, d'une atteinte plus importante de la partie distale des longs axones du TCS, il a été suggéré que la perte des cellules de Betz parfois observée résulterait d'une atteinte initiale à l'extrémité synaptique, se dirigeant ensuite vers le corps cellulaire selon un mécanisme de dégénérescence wallérienne (DeLuca et al., 2004; McDermott et al., 2000; Salinas et al., 2008; Schwarz & Liu, 1956).

Ainsi, l'hétérogénéité génétique de la PSH, les diverses fonctions des protéines impliquées et les données cliniques et histopathologiques semblent indiquer que les axones du TCS (et les axones des colonnes dorsales, dans une moindre mesure) sont les plus touchés et sont plus vulnérables à une variété d'altérations métaboliques.

**Altération du métabolisme lipidique**

SLA : *PIG-B, PLA2G12, OSBPL11*

PSH : *SPG2, SPG5, SPG39*

**Dysfonctionnement et stress du RE**

SLA : *SOD1, TDP-43, FUS, C9ORF72*

PSH : *SPG3A, SPG4, SPG42*

**Dysfonctionnement des endosomes**

SLA : *ALS2, FIG4, SPG11, CHMP2B*

PSH : *SPG4, SPG8, SPG11, SPG53*

**Dysfonctionnement mitochondrial**

SLA : *SOD1, TDP-43, FUS*

PSH : *SPG7*

**Altérations du transport axonal et de l'organisation des microtubules**

SLA : *SOD1, TDP-43*

PSH : *SPG4, SPG10*

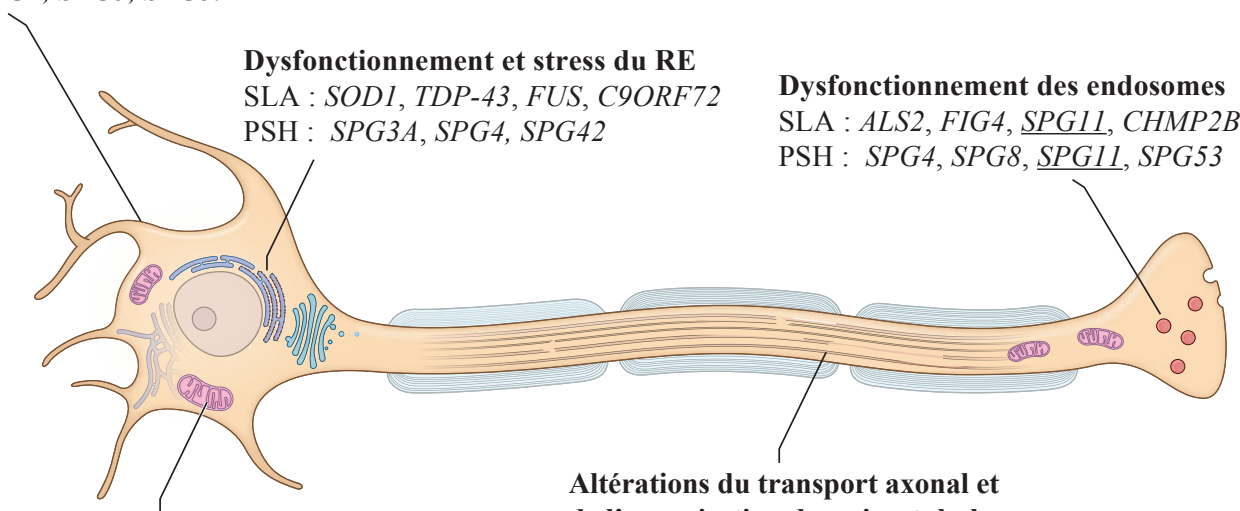


Figure 10. Voies pathologiques communes entre la SLA et la PSH.

La SLA et la PSH présentent une altération de fonctions cellulaires communes en réponse à des mutations génétiques. Ici est illustré, les principales altérations communes retrouvées entre ces deux maladies avec une liste non-exhaustive de gènes impliqués dans chacune d'entre elles. Il apparaît que le gène SPG11 (spatacsine) est commun aux deux maladies (adaptée de (Blackstone, 2012)).

Dans l'ensemble, bien que ces trois maladies puissent avoir des étiologies différentes, elles conduisent à une paralysie progressive et à un handicap moteur plus ou moins prononcé. Au niveau clinique, elles se caractérisent, toutes trois par une dégénérescence du TCS et des NMCS due à un dysfonctionnement de processus cellulaires plus ou moins connus. Malgré l'hétérogénéité de ces maladies, de nombreuses fonctions cellulaires altérées semblent communes au moins à deux de ces pathologies, la SLA et la PSH. Au niveau génétique, certaines mutations sont communes entre SLA et PSH, telles que celles affectant le gène *SPG11* (*Spatacsine*), ou entre SLA et SLP, telle *ALS2* (Mitsumoto et al., 2015; Orlacchio et al., 2010; Yang et al., 2001).

Ainsi bien que ces pathologies se distinguent, les études histopathologiques, cliniques et génétiques mettent en évidence des similarités qui laissent envisager l'existence de facteurs causaux communs à ces maladies neurodégénératives. Par conséquent, l'avancée des recherches dans le cadre de la SLA, notamment au niveau clinique, génétique, mais également concernant les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la maladie ainsi que le développement d'approches thérapeutiques, présentées dans la partie suivante, pourrait fournir de précieuses données pour les deux pathologies citées ci-dessus.



Chapitre III.

## **Sclérose Latérale Amyotrophique**

Ce travail de thèse a porté sur la SLA qui est la MND la plus fréquente. Cette pathologie invalidante et fatale constitue la troisième maladie neurodégénérative de l'adulte après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Renton et al., 2014). En France, la SLA est plus connue sous le nom de maladie de Charcot, en référence au neurologue français Jean-Martin CHARCOT (1825-1893) qui l'a pour la première fois décrite en 1869. Son nom « sclérose latérale amyotrophique » reflète, comme il a été décrit auparavant, la dégénérescence des NMCS et de leurs axones descendants dans la colonne latérale de la moelle épinière (sclérose latérale) et la dégénérescence des MnBS de la corne antérieure de la moelle épinière avec dénervation et atrophie musculaire (amyotrophique) (Rowland & Shneider, 2001). Aux États-Unis, la SLA est connue sous le nom de maladie de Lou Gehrig, en référence au grand joueur de baseball qui a développé la maladie dans les années 1930.

### 1. Aspects Cliniques

#### 1.1 Description clinique

Comme évoqué précédemment, la SLA se définit cliniquement par l'atteinte combinée des NMCS et des MnBS. De ce fait, les examens neurologiques révèlent une atteinte des NMCS, ou syndrome pyramidal, qui se traduit par des mouvements lents, une spasticité, une hyperréflexie et le signe de Babinski, ainsi qu'une atteinte des MnBS qui se traduit par des fasciculations avec une faiblesse et une atrophie musculaire conduisant à une paralysie progressive suivie d'une insuffisance respiratoire engageant le pronostic vital (cf. Figure 9) (pour revue voir (Eisen, 2009)). L'âge d'apparition de la maladie se situe généralement entre 50 et 60 ans avec un décès survenant 3 à 5 ans après le diagnostic (Kiernan et al., 2011).

La SLA débute le plus souvent par des crampes et des faiblesses musculaires caractéristiques d'un déficit moteur lié à une atrophie des muscles des membres ou bulbaires, habituellement de façon asymétrique et focalisée. La majorité des patients atteints de SLA (60-65%) présente une forme spinale de la maladie, avec une atteinte initiale des membres supérieurs ou inférieurs. La maladie se propage aux autres membres et évolue vers une paralysie généralisée à presque tous les muscles squelettiques. La forme bulbaire correspond quant à elle à une atteinte initiale des muscles du cou et de la face. Les patients SLA présentent également une perte de poids négativement corrélée à la survie (Marin et al., 2011; Paganoni et al., 2011) et associée à un hypermétabolisme énergétique (Bouteloup et al., 2009; Dupuis et al., 2011). D'autre part, des anomalies cognitives et comportementales peuvent être observées chez certains patients. En effet, 15% des patients atteints de SLA développent à terme une démence fronto-temporale (DFT) (Ling et al., 2013; Lomen-Hoerth et al., 2002) et plus de 50% des patients présentent des altérations comportementales et cognitives telles qu'une apathie, perte d'empathie ou désinhibition, associées à une atteinte des fonctions exécutives et du langage (Snowden et al., 2013).

### 1.2 Epidémiologie

Bien que la SLA soit la troisième maladie neurodégénérative en termes de fréquence, elle demeure relativement rare à l'échelle de la population. Son incidence est stable dans les pays d'Europe occidentale et d'Amérique du Nord, avec environ 2 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an (Couratier et al., 2016). L'incidence de la SLA augmente avec l'âge, avec un pic observé entre 50 et 60 ans (Couratier et al., 2016; Logroscino et al., 2008). La plupart des études épidémiologiques sont en faveur d'une légère prédominance masculine avec un ratio homme/femme de l'ordre de 1,5/1 (Logroscino et al., 2008, 2010; van Es et al., 2017). La prévalence relativement faible, qui se situe aux alentours de 4,6 cas pour 100 000 habitants, est le reflet de la létalité rapide de la maladie (Joensen, 2012; Logroscino et al., 2010; van Es et al., 2017).

Bien que la SLA ne semble pas être associée à une ethnie particulière, un taux d'incidence particulièrement élevé d'une forme de SLA, associée à la démence et au parkinsonisme, a été décrite dans l'île de Guam, la Nouvelle-Guinée et la péninsule de Kii au Japon. La découverte de ces groupes ethniques a conduit à s'interroger sur le rôle possible d'une exposition à des facteurs environnementaux dans le développement de la maladie. La consommation alimentaire de fortes concentrations d'une neurotoxine analogue du glutamate (L- $\beta$ -méthylaminoalanine), par ces populations indigènes serait à l'origine de ces cas atypiques de SLA (Spencer et al., 1987). Enfin, une quantité croissante de données suggère que l'environnement (neurotoxines, pesticides) pourrait jouer un rôle dans le développement de la SLA (Spencer et al., 1987; Zufiría et al., 2016).

### 1.3 Génétique de la SLA

La SLA est traditionnellement répartie en deux catégories : sporadique (SLAs) représentant 90% des cas, et familiale (SLAf) représentant 10% des cas. La SLAs touche des patients sans liens génétiques apparents et sans antécédents familiaux. La SLAf est généralement héritée de manière autosomale dominante et est causée par des mutations dans différents gènes (Andersen & Al-Chalabi, 2011). Si les formes de SLAs et SLAf sont cliniquement similaires, elles diffèrent d'un point de vue épidémiologique. Les cas de SLAf se déclarent généralement plus précocement, aux alentours de 40 ans (Kiernan et al., 2011), leur progression est généralement plus rapide et le ratio H/F est de 1/1 (Battistini et al., 2005; Hand & Rouleau, 2002; Wijesekera & Leigh, 2009).

Au cours des deux dernières décennies, des preuves concernant la contribution de la génétique dans le développement de la SLA se sont accumulées. Une étiologie génétique a été identifiée dans 10 à 20% des patients diagnostiqués avec une SLAs et 60% des patients SLAf (Andersen & Al-Chalabi, 2011; van Es et al., 2017) (Figure 11).

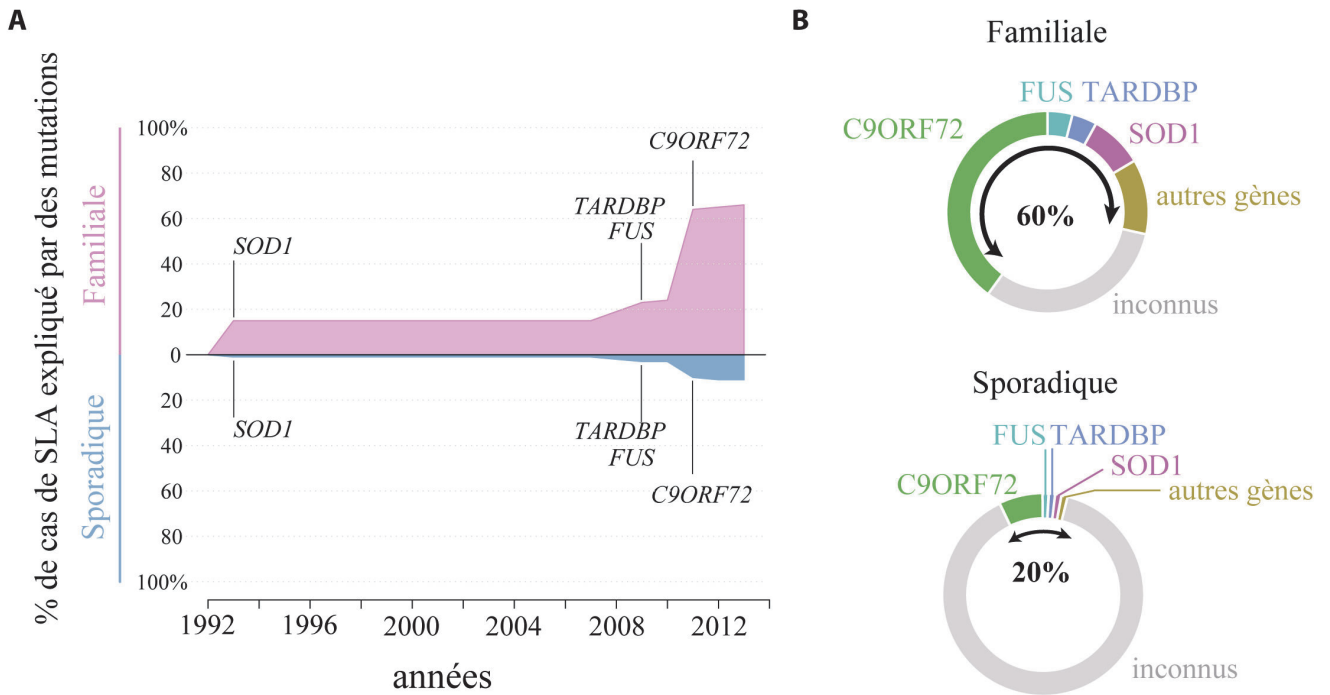


Figure 11. **Découverte des principales mutations géniques dans la SLA familiale et sporadique**

**A.** Le graphique indique l'ordre de découverte des mutations génétiques les plus décrites dans la SLA (*SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72*) ainsi que le pourcentage des cas de SLA (familiale et sporadique) expliqués pour chacune d'entre elles.

**B.** Les graphiques montrent qu'environ 60% des cas de SLA familiaux sont expliqués par ces gènes alors que seulement 20% pour les cas de SLA sporadiques (adaptée de Renton, 2014).

Il existe des gènes causaux qui conduisent fréquemment à une hérédité autosomique dominante sous forme pure ou associée à d'autres syndromes neurodégénératifs (10% des cas) (Millecamps et al., 2012; Mok et al., 2012). D'autre part, il existe des gènes de prédisposition qui sont associés à un risque accru de développer une forme sporadique de la maladie. La plupart des gènes causatifs et de susceptibilité sont impliqués dans certaines fonctions cellulaires particulières, tel que notamment le traitement de l'ADN et l'ARN, le transport des vésicules, le stress oxydatif et le métabolisme cellulaire (pour revues, voir (Ghasemi & Brown, 2017; Zufiria et al., 2016)). Dans cette partie ne seront développés que les gènes causatifs majeurs impliqués dans les formes de SLAf dans l'ordre de découverte. Le tableau 2 regroupe les principales mutations liées à la SLAf.

### 1.3.1 Superoxyde Dismutase cytosolique à Cuivre et Zinc (SOD1)

En 1993, le premier gène identifié comme étant impliqué dans une forme familiale de SLA fut découvert par Rosen et son équipe (Figure 11). Il s'agit du gène codant pour l'enzyme superoxyde dismutase cytosolique à cuivre et zinc (SOD1) (Rosen et al., 1993). Cette enzyme, composée de 153 acides aminés, est impliquée dans la détoxification cellulaire. Sa principale fonction est de convertir les radicaux libres superoxyde (un produit toxique provenant de la phosphorylation oxydative mitochondriale) en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (Figure 11). Cette enzyme ubiquitaire est particulièrement abondante dans le système nerveux central (SNC), puisqu'elle constitue environ 1% des protéines cérébrales.

Les mutations du gène *SOD1* sont à l'origine d'environ 20% des formes familiales de la maladie et de 1 à 3% des cas sporadiques de SLA (Gamez et al., 2006; Rosen et al., 1993). Plus de 150 mutations différentes ont été identifiées, dont certaines affectent le site actif et d'autres sa structure (Andersen & Al-Chalabi, 2011) (Figure 12A). Les mécanismes par lesquels les mutations de *SOD1* conduisent à la SLA ne sont pas encore clairement identifiés, mais un mécanisme de gain de fonction est favorisé (Figure 12B). En effet, les souris déficientes en *SOD1* ne présentent pas de dégénérescence des MnS (Reaume et al., 1996), alors que les souris surexprimant un mutant de *SOD1* dépourvu d'activité dismutase développent une dégénérescence des MnS (Gurney et al., 1994). La plupart des mutations sur ce gène sont des mutations faux-sens, mais des délétions et des insertions ont également été rapportées. La plupart des mutations sont autosomiques dominantes, à l'exception de quelques-unes transmises de façon récessive telles que la mutation D90A (Robberecht et al., 1996). De plus, une hétérogénéité phénotypique considérable est observée entre les différentes mutations du gène *SOD1*. La mutation A4V, qui est la variante la plus fréquente, donne lieu à une forme agressive de SLA qui conduit habituellement à la mort dans l'année qui suit l'apparition des symptômes (Cudkowicz et al., 1997). En revanche, la mutation homozygote D90A est associée à une forme moins agressive, qui peut progresser sur une dizaine d'années (Andersen et al., 1996).

**Tableau 2. Principaux gènes impliqués dans les cas de SLA familiale**

| Locus       | Gène           | Protéine             | Transmission | Fonction protéique            |
|-------------|----------------|----------------------|--------------|-------------------------------|
| 21q22.1     | <i>SOD1</i>    | Superoxyde dismutase | AD           | Détoxification cellulaire     |
| 9p21        | <i>C9ORF72</i> | –                    | AD           | Liaison à l'ARN               |
| 16p11       | <i>FUS</i>     | FUS                  | AR           | Métabolisme de l'ARN          |
| 1p36        | <i>TARDBP</i>  | TDP-43               | AD           | Métabolisme de l'ARN          |
| 20q13       | <i>VAPB</i>    | VAPB                 | AD           | Trafic vésiculaire            |
| 10p13       | <i>OPTN</i>    | Optineurine          | AR/AD        | Trafic vésiculaire            |
| 2p13        | <i>DCTN1</i>   | Dynactine            | AD           | Transport axonal              |
| 14q11.1     | <i>ANG</i>     | Angiogénine          | AD           | Angiogénèse                   |
| 12q23-q24.1 | <i>ATXN2</i>   | Ataxine 2            | -            | Traduction ARN                |
| Xp11.21     | <i>UBQLN2</i>  | Ubiquitine 2         | XD           | Protéasome                    |
| 3p12.1      | <i>CHMP2B</i>  | CHMP2B               | AD           | Trafic vésiculaire            |
| 17p13.3     | <i>PFN1</i>    | Profiline 1          | AD           | Cytosquelette                 |
| 5q35        | <i>SQSTM1</i>  | Sequestrosome 1      | AD           | Autophagie/<br>ubiquitination |
| 2q33        | <i>ALS2</i>    | Alsine               | AR           |                               |

AD : autosomique dominant; AR : autosomique récessif; XD : dominance liée à l'X (adapté de Taylor, Brown and Cleveland, 2016).

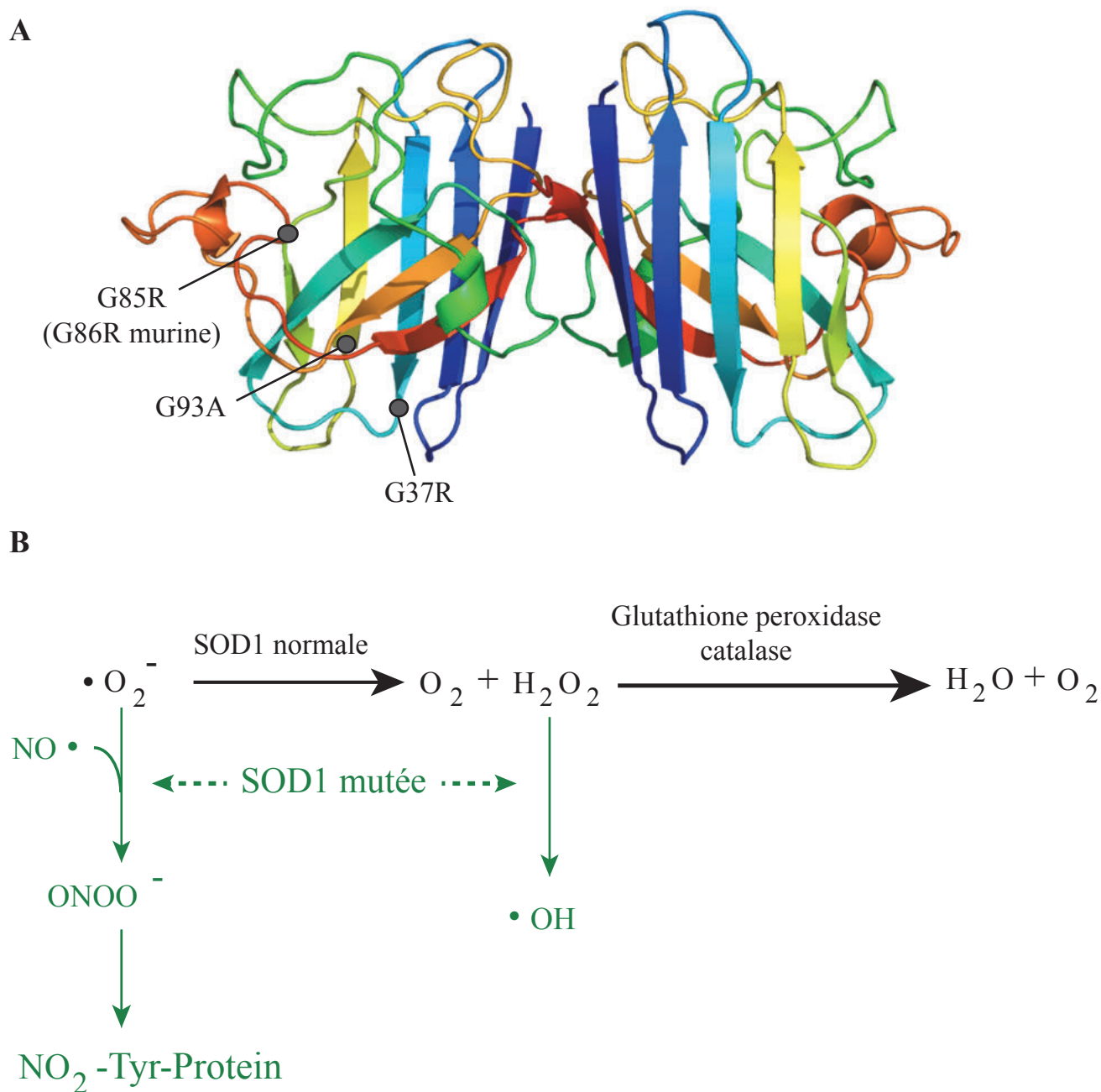


Figure 12. **Enzyme superoxyde dismutase 1 dans la SLA**

**A.** Structure tridimensionnelle de la protéine SOD1 présentant la localisation de certaines mutations *SOD1* retrouvées dans 20% des cas de SLA, dont le point de mutation G85R retrouvé chez l’homme correspondant à la mutation G86R chez la souris. **B.** Représentation de la réaction enzymatique physiologique de la SOD1, responsable de la conversion du superoxyde en oxygène et peroxyde d’hydrogène (en noir). Les mutations de l’enzyme conduiraient à un gain de fonction de la SOD1 conduisant à la formation de radicaux libres OH• (activité peroxydase) et de peroxynitrite (ONOO•) qui conduisent à la nitration des résidus tyrosine des protéines (en vert) (adaptée de Barber and Shaw, 2010).

### 1.3.2 TAR DNA-Binding Protein-43 (TDP-43)

Les mutations dans le gène *TAR DNA Binding Protein (TARDBP)* sont responsables d'environ 3% des cas de SLAf, 1,5% des cas de SLAs et de rares cas de DFT. À ce jour, plus de 40 mutations ont été identifiées et la grande majorité sont des mutations faux-sens situées dans la partie C-terminale (Kabashi et al., 2008; Lattante et al., 2013) (Figure 11). La protéine TDP-43 (TARDBP-43), est une protéine nucléaire exprimée de façon ubiquitaire et hautement conservée, ayant diverses fonctions dans le métabolisme de l'ARN, y compris la transcription, l'épissage et le transport de l'ARNm (Lee et al., 2015). En 2006, Neumann et ses collègues ont découvert que la forme phosphorylée de cette protéine TDP-43 est la composante majeure des agrégats protéiques cytoplasmiques retrouvés dans le cerveau et la moelle épinière des patients SLA (Neumann et al., 2006), qu'il s'agisse de cas sporadiques ou familiaux, à l'exception des patients présentant des mutations sur les gènes *SOD1* ou *FUS (fused in sarcoma)* où une protéinopathie SOD1 ou FUS semblerait prédominante (Farrarwell et al., 2015; Rademakers et al., 2010).

### 1.3.3 Fused in Sarcoma (FUS)

Peu de temps après la découverte des mutations *TARDBP* dans la SLA, des mutations du gène *FUS*, codant pour la protéine du même nom ont été identifiées (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Plus de 50 mutations du gène *FUS* ont maintenant été décrites dans la SLA et sont responsables d'environ 5% de SLAf, moins de 1% de SLAs et de rares cas de DFT (Kwiatkowski et al., 2009; Lattante et al., 2013; Vance et al., 2009) (Figure 11). La protéine FUS est principalement nucléaire, capable de lier l'ADN et l'ARN, et qui partage des homologies fonctionnelles avec la protéine TDP-43. En effet, elle est également impliquée dans plusieurs étapes du métabolisme de l'ARN, telles que la transcription et l'épissage (Lagier-Tourenne et al., 2012). La protéine FUS est également le composant majeur des granules de stress cytoplasmiques qui sont des agrégats cytoplasmiques contenant un complexe de protéines (protéines de liaison à l'ARN par exemple) et d'ARNm. Ces granules se forment en réponse à un stress afin de réguler l'expression de gènes en stockant les ARNm (Li et al., 2013).

Les mutations du gène *FUS* affectent pour la plupart le signal de localisation nucléaire de la protéine, conduisant à la rétention de la protéine FUS dans le cytoplasme et une augmentation de la formation des granules de stress (Aulas & Vande Velde, 2015). Au laboratoire, Jelena Scekcic-Zahirovic a récemment montré que cette rétention cytoplasmique de la protéine FUS tronquée conduit à la mort des MnS, selon un mécanisme de gain de fonction toxique (Scekcic-Zahirovic et al., 2016). Ainsi, l'identification des mutations dans le gène *FUS* peu de temps après *TARDBP* a ainsi souligné l'importance de l'altération du métabolisme de l'ARN dans la mort des motoneurones.



### 1.3.4 Chromosome 9 Open Reading Frame 72 (C9ORF72)

Quelques années plus tard, en 2011, une grande expansion du motif d'hexanucléotides G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> a été découverte dans une région non codante du gène *C9ORF72*. La présence de ces expansions a été identifiée dans 40% des cas de SLAf, 7 % des cas de SLAs, ainsi que 25% des cas de DFT (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Majounie et al., 2012; Renton et al., 2011) (Figure 11). La fonction de la protéine codée par ce gène est inconnue, tout comme le mécanisme de toxicité des expansions répétées. Cependant, trois mécanismes pathologiques ont été proposés : 1) une haplo-insuffisance, 2) une séquestration de protéines de liaison à l'ARN par les foci nucléaires d'ARN produits par ces expansions, 3) une toxicité liée à la formation d'agrégats intra-cytoplasmiques composés de dipeptides protéiques issus de la traduction de ces hexanucléotides (Koppers et al., 2015).

Bien que d'autres gènes aient été liés aux formes mendéliennes de la maladie, leur importance épidémiologique est presque résiduelle. Ainsi, ensemble, les 4 gènes décrits ci-dessus (*SOD1*, *FUS*, *TARDBP* et *C9ORF72*) représentent environ 60% des cas de SLAf (Figure 11).

## 1.4 Diversité de la SLA

La SLA est une maladie hétérogène, de par la multiplicité des gènes mis en cause, mais également en raison des variations de sa présentation clinique. En effet, une variabilité phénotypique peut être observée en fonction du site d'apparition des atteintes motrices, de sa répartition, de la prédominance des atteintes d'un type neuronal (NMCS ou MnBS), de l'âge d'apparition des symptômes, et de la durée de la maladie.

### 1.4.1 Différents sites d'apparition de la maladie

La plupart des cas de SLA (80%) débutent avec une faiblesse asymétrique et indolore dans un des membres, caractéristique d'une forme spinale de la maladie. À l'inverse, 20% des patients SLA présentent d'abord une faiblesse des muscles innervés par les MnB, associée à une dysarthrie (trouble de l'élocution), une dysphagie (gêne lors de la déglutition) et des fasciculations de la langue, caractéristiques d'une forme bulbaire de la maladie (Swinnen & Robberecht, 2014). Ces formes bulbaires sont associées à une progression plus rapide de la maladie et à un mauvais pronostic par rapport aux formes spinales (Swinnen & Robberecht, 2014).

### 1.4.2 Variabilité de l'âge de début et de la durée de la maladie

Bien que le début de la maladie se produise généralement entre 50 et 60 ans, il existe des cas de SLA apparaissant avant 25 ans et appelés formes juvéniles de la maladie, ou apparaissant plus tardivement vers l'âge de 80 ans (Pupillo et al., 2014).

La survie moyenne, généralement de 3 à 5 ans, peut varier de quelques mois à une vingtaine d'années. Les formes juvéniles de SLA se caractérisent par une progression plus lente de la maladie tandis qu'une durée plus courte de survie est associée aux formes tardives (Pupillo et al., 2014; Sabatelli et al., 2008). De plus, il est noté que 60% des patients atteints de la SLA entre 20 et 40 ans présentent une prédominance de l'atteinte des NMCS (Pupillo et al., 2014; Sabatelli et al., 2008). En outre, il existe de grandes différences en ce qui concerne l'âge de début de la maladie et la survie chez les patients SLA et ce, même entre les individus d'une famille, porteurs de mutations identiques (Penco et al., 2011; Régal et al., 2006). Cela suggère l'existence d'autres facteurs pouvant modifier le phénotype (Penco et al., 2011; Swinnen & Robberecht, 2014).

### 1.4.3 Diversité des signes cliniques observés

La présentation clinique peut différer en fonction de la prédominance de l'atteinte d'un des NMCS et des MnBS. Lorsque les premiers signes cliniques observés sont ceux de l'atteinte des NMCS, la SLP est diagnostiquée. Mais comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, de nombreux patients atteints de SLP viennent à développer des signes de l'atteinte des MnBS et répondent aux critères de diagnostic de la SLA (D'amico et al., 2013). À l'inverse, lorsque des patients présentent des signes cliniques d'une atteinte des MnBS uniquement, la maladie diagnostiquée est alors l'atrophie musculaire progressive. Certains de ces patients finissent par développer des signes d'une atteinte des NMCS au cours de la progression de la maladie et répondent alors eux aussi aux critères de diagnostic de la SLA (Cervenakova et al., 2000).

Bien que la dégénérescence qui caractérise la SLA affecte de manière prédominante le système moteur, de nombreuses études ont montré qu'au moins 50% des patients présentent des troubles cognitifs modérés, et 15 à 18% présentent les critères diagnostics de DFT (Lillo & Hodges, 2009; Lomen-Hoerth et al., 2002; Ringholz et al., 2005). La DFT résulte de la dégénérescence des neurones du cortex préfrontal et temporal, conduisant à des troubles cognitifs et comportementaux ainsi qu'à des troubles du langage. À l'inverse environ 15% des patients atteints de DFT pure évoluent également vers une atteinte des MnBS et une SLA (Burrell et al., 2011). Par ailleurs, presque tous les cas de SLA et plus de la moitié des patients atteints de DFT présentent des inclusions cytoplasmiques de protéines TDP-43 phosphorylées dans les neurones corticaux (Neumann et al., 2006; van Langenhove et al., 2012). Enfin, la découverte récente de mutations du gène *C9ORF72* dans la SLA et la DFT renforce le lien entre ces deux pathologies (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011; van Langenhove et al., 2012). L'ensemble de ces données a permis de proposer l'existence d'un continuum entre SLA et DFT, où les deux maladies représenteraient les deux extrémités opposées de ce continuum (Ling et al., 2013) (Figure 13).

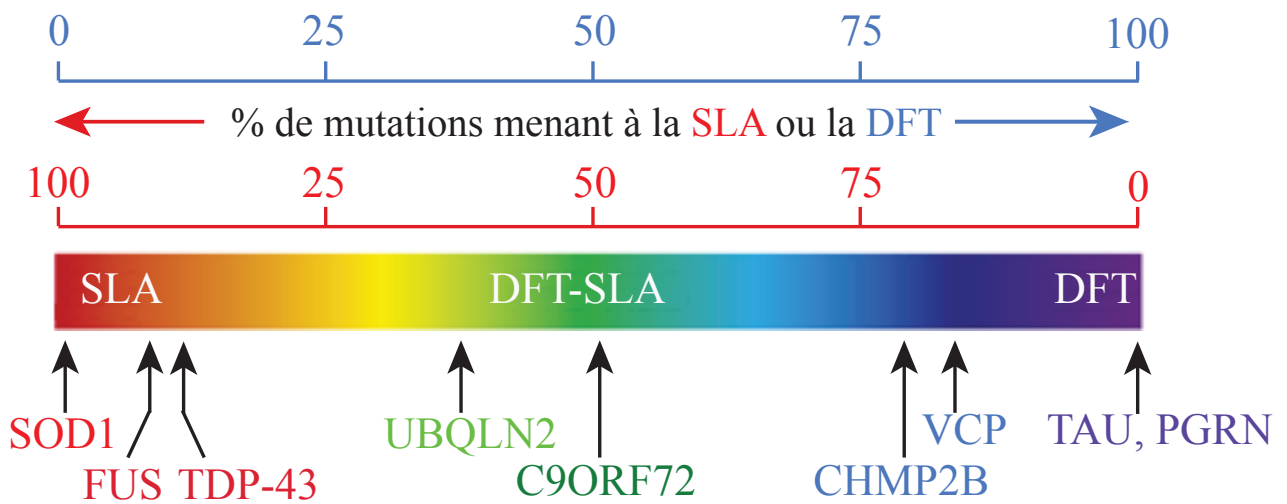


Figure 13. **Continuum sclérose latérale amyotrophique et démence fronto-temporale**

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT) se situent aux extrémités d'un continuum neurodégénératif. Les principales causes génétiques connues de ces deux maladies sont positionnées le long de ce spectre en fonction de leur représentation dans les cas familiaux de chaque pathologie (adaptée de (Ling et al., 2013)).

Ainsi, la variabilité phénotypique observée montre que la SLA est une maladie neurodégénérative hétérogène et complexe. Le continuum observé entre SLA et DFT élargit le spectre clinique de la SLA et la prédominance de l'atteinte des NMCS ou des MnBS chez les patients SLA rend difficile la distinction de cette maladie avec les maladies issues de l'atteinte de l'une ou l'autre de ces populations. L'établissement de critères de diagnostic très précis et de méthodes d'évaluation est par conséquent primordial.

### **1.5 Diagnostic et méthodes d'évaluation de la SLA**

En raison de la variabilité phénotypique et de la nature progressive de la SLA, le tableau clinique peut être incomplet au début des symptômes et difficile à établir. L'accès à des critères de diagnostic bien définis, basés sur des examens cliniques et des études électrophysiologiques, est alors nécessaire pour aider à différencier cette maladie d'autres maladies présentant des symptômes similaires, telles que la SLP ou l'atrophie musculaire progressive.

#### **1.5.1 Les critères de diagnostics : critères d'El Escorial**

Les critères El Escorial (1994) et leurs formes révisées plus récentes, les critères d'Airlie House (1999) et d'Awaji (2008) ont été développés pour établir le diagnostic de la SLA et le niveau d'atteinte des patients. Ils définissent le niveau de certitude du diagnostic et permettent de standardiser les essais cliniques et les études menées sur la SLA.

Le diagnostic de la SLA nécessite 1) l'atteinte conjointe des NMCS et des MnBS, 2) une progression de la maladie, et ce 3) en l'absence de preuve d'une autre maladie qui pourrait expliquer ces signes. Selon la présence des signes de l'atteinte des NMCS et MnBS et leur répartition dans quatre régions (bulbaire, membre supérieur, thoracique, membre inférieur), les critères classent les patients dans différents degrés de certitude diagnostique : possible, probable avec confirmation de laboratoire, probable et définitif (Brooks, 1994; Brooks et al., 2000; Mitchell, 2000). Ces critères sont présentés dans le Tableau 3.

#### **1.5.2 Principales méthodes d'évaluation du diagnostic**

En raison de l'absence de biomarqueurs spécifiques de maladie (pour revue voir, (Turner et al., 2009)), les critères de diagnostic clinique sont renforcés par une série de tests cliniques, incluant des études électrophysiologiques et de neuroimagerie pour évaluer des caractéristiques physiologiques permettant de différencier la SLA d'autres maladies et de suivre son évolution (Brooks et al., 2000).

##### **1.5.2.1 Études électrophysiologiques**

L'atteinte des MnBS est évaluée par des études de conduction nerveuse et d'électromyographie.

**Tableau 3. Les quatre niveaux de certitude diagnostique de la SLA suivant les critères révisés d'El Escorial**

| <b>Niveau de certitude du diagnostic</b>    | <b>Critères diagnostiques</b>  |
|---|--|
| SLA définie                                 | Signes d'atteinte des NMCS et des MnBS dans trois régions  |
| SLA cliniquement probable                   | Signes d'atteinte des NMCS et des MnBS dans au moins deux régions, certains signes d'atteinte des NMCS étant situés au-dessus des signes d'atteinte des MnBS.  |
| SLA probable sur des critères paracliniques | Signes d'atteinte des NMCS et des MnBS dans une seule région, <i>ou</i> signes d'atteinte des NMCS dans une région et signes d'atteinte des MnBS dans au moins deux régions (d'après électromyographie).                           |
| SLA possible                                | Signes d'atteinte des NMCS et des MnBS dans une seule région, <i>ou</i> signes d'atteinte des NMCS dans au moins deux régions, <i>ou</i> signes d'atteinte des MnBS dans un territoire et signes sous-jacents d'atteinte des NMCS. |

NMCS : neurones moteurs cortico-spinaux; MnBS : motoneurones bulbaires et spinaux (adapté de (Brooks et al., 2000)).

Les études de conduction nerveuse sont cruciales, car elles permettent d'exclure d'autres maladies touchant les nerfs périphériques, les JNM et les muscles, qui peuvent imiter le phénotype de la SLA (Brooks et al., 2000; Joyce & Carter, 2013). Ces études révèlent une réduction de l'amplitude des potentiels d'action musculaires composés et un léger ralentissement de la vitesse de conduction motrice chez les patients SLA, signes d'une perte axonale des MnBS. Ces potentiels correspondent à la sommation des activités électriques produites par toutes les unités motrices activées de façon synchrone lors d'une stimulation nerveuse (Daube, 2000; Joyce & Carter, 2013).

L'électromyographie (EMG) permet de rendre compte du dysfonctionnement des MnBS avec : la présence de potentiels de fibrillations et de fasciculations, une réduction du recrutement des unités motrices avec une fréquence de décharge rapide des unités motrices restantes ainsi que des potentiels d'unités motrices de longue durée et de grande amplitude (Joyce & Carter, 2013; Krarup, 2011; Sorenson, 2012).

L'estimation du nombre d'unités motrices (MUNE) fournit quant à elle des informations quantitatives sur le nombre d'axones innervant un muscle et permet d'évaluer la perte progressive des axones des motoneurones au cours de la pathologie (Bromberg & Brownell, 2008).

L'évaluation de l'atteinte des NMCS se fait par SMT (Menon, Geevasinga, et al., 2015; Vucic & Kiernan, 2008). La SMT est basée sur l'application d'une impulsion magnétique sur la boîte crânienne, afin d'induire un courant électrique se propageant dans le cortex cérébral, le long des axones des NMCS et des MnBS. Selon la région cérébrale stimulée, une réponse peut être enregistrée dans les muscles des membres supérieurs ou inférieurs. La SMT permet de mesurer plusieurs paramètres dont le potentiel évoqué moteur (PEM, activité électrique musculaire mesurée en réponse à une stimulation corticale), le seuil d'excitabilité du cortex moteur, le temps de conduction moteur central (durée entre la stimulation corticale et la génération d'un potentiel d'action par les MnBS) et la période de silence cortical (évaluation de l'inhibition intracorticale).

L'atteinte des NMCS se caractérise d'un point de vue électrophysiologique par de faibles taux de décharge des potentiels d'unités motrices lors d'un effort intense et plus de 30% d'augmentation du temps de conduction moteur central signe d'une perte de fibres myélinisées (Brooks et al., 2000). Des études de SMT ont montré un temps de conduction central prolongé (Floyd et al., 2009; Urban et al., 1998) et une augmentation de l'amplitude des PEM chez les patients souffrant de SLA (Menon, Kiernan, et al., 2015; Vucic et al., 2008). En outre, il a été observé une réduction du seuil de stimulation cortical au début de la maladie (Menon, Kiernan, et al., 2015; Mills & Nithi, 1997; Urban et al., 1998) et une réduction des périodes de silence cortical, signes potentiels d'une hyperexcitabilité corticale (Menon, Kiernan, et al., 2015; Vucic et al., 2008).

Il est intéressant de noter que des études ont mis en évidence une hyperexcitabilité corticale chez des patients porteurs asymptomatiques de mutations SOD1, FUS et *C9ORF72* (Blair et al., 2010; Geevasinga, Menon, Nicholson, et al., 2015; Menon, Kiernan, et al., 2015; Vucic et al., 2008; Vucic & Kiernan, 2006). De plus, à l'apparition des symptômes, ces patients présentent une hyperexcitabilité corticale semblable à celle observée chez les patients SLAs (Vucic et al., 2008). Il est donc possible que les cas sporadiques de SLA présentent également une hyperexcitabilité corticale présymptomatique. Ainsi la SMT permet de renseigner sur l'intégrité fonctionnelle de la population de NMCS (Vucic & Kiernan, 2008), et est proposée comme outil de diagnostic de la maladie (Vucic et al., 2013).

### 1.5.2.2 Études de neuro-imagerie

L'utilisation de la neuro-imagerie pour le diagnostic de la SLA a pour but de rechercher les signes typiques de la SLA et d'exclure les lésions structurales (par exemple, une tumeur spinale) pouvant mimer le phénotype de la SLA, notamment dans les cas de SLA diagnostiqués probables ou possibles (Brooks et al., 2000). L'IRM cérébrale et médullaire peut être utilisée pour révéler des lésions dans le TCS, qui apparaissent au niveau du cerveau, du tronc cérébral et de la moelle épinière (Abe et al., 1997; Thorpe et al., 1996; Waragai, 1997). L'analyse par IRM de l'épaisseur corticale a révélé un amincissement progressif du cortex moteur et une perte progressive du volume de la substance grise du gyrus précentral lors du suivi de patients SLA (Agosta et al., 2012; Kwan et al., 2012). En outre, ces analyses ont également indiqué que cet amincissement peut être également observé dans les lobes du cerveau frontal et temporal dans les formes agressives de la maladie (Agosta et al., 2012; Mezzapesa et al., 2013; Verstraete et al., 2012).

Ainsi, en l'absence de biomarqueur de la maladie, les critères établis permettent de clarifier le cadre clinique de la SLA et le diagnostic de la maladie. L'établissement du diagnostic reste néanmoins difficile du fait de la grande hétérogénéité de la présentation clinique de la SLA, notamment au début de la maladie. Il est cependant primordial de pouvoir reconnaître les premiers signes de la maladie et de la distinguer d'autres affections neurologiques pouvant mimer son phénotype, afin de pouvoir prendre en charge les patients SLA de manière adaptée. Il est donc important de poursuivre les recherches vers de nouveaux outils de diagnostic et des biomarqueurs afin de permettre un diagnostic plus précoce et certain de la maladie.

## 1.6 Approches thérapeutiques de la SLA

Malheureusement, à ce jour, aucun traitement curatif n'existe pour la SLA. L'un des principaux obstacles au développement de nouvelles thérapies est que la quasi-totalité des molécules prometteuses en préclinique se révèlent inefficaces dans les essais cliniques. De plus,

l'absence de marqueurs précoces et/ou spécifiques à la maladie rend difficile l'interprétation des résultats des études cliniques.

Ainsi, malgré un grand nombre de molécules testées, seules deux molécules sont actuellement autorisées dans le traitement de la SLA : le Riluzole et l'Edaravone. Le Riluzole est un agent neuroprotecteur qui agit en inhibant les canaux sodiques voltage-dépendants (Zona et al., 1998) et la libération du glutamate (Wang, Wang, et al., 2004), et en favorisant sa recapture par les astrocytes (Fumagalli et al., 2008). Cette diminution de la concentration extracellulaire de glutamate par le Riluzole permettrait de réduire l'excitotoxicité glutamatergique. L'effet du Riluzole reste malheureusement très modéré, avec un allongement de la survie des patients de 2 à 3 mois (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996; Riviere et al., 1998). Très récemment, l'Edaravone, un agent antioxydant puissant et capteur de radicaux libres, a été approuvé comme nouvelle option thérapeutique pour la SLA au Japon, en Corée du Sud, et aux États-Unis. Un essai clinique de phase 3 a révélé que l'Edaravone permet de réduire le déclin fonctionnel des patients de 33% sur 6 mois (Sawada, 2017).

La thérapie génique est une approche thérapeutique prometteuse pour la SLA. Elle permet de délivrer spécifiquement des molécules d'intérêt thérapeutique aux neurones atteints. En particulière, une approche de blocage de l'expression de *SOD1*, à l'aide de petits ARN interférents (ARNi) s'est révélée efficace et très prometteuse (Ralph et al., 2005). Une récente étude de phase I a montré une bonne tolérance des oligonucléotides anti-sens dirigés contre le gène *SOD1* chez des patients présentant cette mutation (Miller et al., 2013). Cela donne l'espoir que de telles stratégies thérapeutiques, bien que très ciblées et applicables uniquement à un faible pourcentage de patients porteurs de mutations identifiées, seraient réalisables dans le traitement de la SLA.

Une autre approche envisagée est l'utilisation de cellules souches, qui ont la capacité de se différencier en neurones et cellules gliales. Des essais cliniques basés sur la transplantation de cellules souches humaines dans la moelle épinière de patients SLA ont été initiés (Feldman et al., 2014).

Enfin, la SLA reste une maladie incurable, de ce fait les traitements médicamenteux symptomatiques sont essentiels pour améliorer la qualité de vie des patients, en ciblant autant que possible les troubles liés à la pathologie tels que la douleur, les troubles du sommeil, la spasticité, les problèmes salivaires, la dépression ou encore les troubles digestifs (Ng et al., 2017). Néanmoins, les études associées aux mécanismes responsables de la dégénérescence des neurones moteurs dans la SLA ne cessent d'augmenter, ouvrant de nouvelles perspectives de traitements (Mathis et al., 2017).

Dans l'ensemble, la SLA est une maladie hétérogène ce qui rend difficile son diagnostic. Les critères consensuels établis ont permis une avancée majeure pour définir le cadre clinique de la



SLA et établir un diagnostic, basé sur des examens cliniques et des études électrophysiologiques et de neuro-imagerie. Parmi ces études, il apparaît que la SMT et l'IRM permettent d'évaluer l'atteinte des NMCS et du TCS dans la pathologie. Une hyperexcitabilité corticale (détectée par SMT), un amincissement cortical (détecté par IRM) et une atteinte du TCS (détectée par SMT et IRM) constituent de bons marqueurs de l'implication de cette population neuronale dans la SLA. Enfin, la SLA reste à ce jour une maladie incurable. Il est donc primordial de poursuivre les recherches et d'identifier les mécanismes pathologiques clés de la maladie.

## 2. Caractéristiques histopathologiques de la SLA

Outre la dégénérescence des NMCS et des MnBS, la SLA se caractérise également par une gliose réactionnelle, la présence d'inclusions intra-cytoplasmiques dans les neurones et les glies, ainsi que d'une atrophie musculaire (pour revue, voir (Ince & Wharton, 2007)).

L'atteinte des cellules de Betz (sous-population des NMCS) se traduit par une perte des corps cellulaires, une diminution du nombre d'épines dendritiques, une dégénérescence axonale et une perte de la myéline (Hammer et al., 1979; Mochizuki et al., 1995; Nihei et al., 1993; Sasaki & Iwata, 2000). L'atteinte des MnBS se traduit également par une atrophie et une perte des corps cellulaires ; il existe cependant des variations selon les segments spinaux analysés (Ince & Wharton, 2007).

De plus, les neurones et les glies présentent une accumulation de dépôts arrondis ou filiformes de protéines agrégées appelés inclusions (Nihei et al., 1993). Ces inclusions peuvent être le résultat d'un mauvais repliement protéique dû à des mutations, des dommages protéiques tels que l'oxydation ou l'accumulation de protéines présentes en grande quantité. Parmi ces inclusions on retrouve des corps de Bunina et des inclusions ubiquitinylées (Leigh et al., 1988). Chez de nombreux patients atteints de SLA, il a été montré que ces inclusions ubiquitinylées se composent majoritairement de protéines TDP-43 ubiquitinylées et phosphorylées (Neumann et al., 2006). On observe également des boursouffures des axones, ainsi que l'accumulation intra-cytoplasmique de neurofilaments phosphorylés, des anomalies mitochondriales et une fragmentation de l'appareil de golgi (Ince & Wharton, 2007; Strong et al., 2005).

D'autres caractéristiques pathologiques sont associées à des gènes spécifiques. Par exemple, les cas de SLA causés par les expansions répétées d'hexanucléotides dans le gène *C9ORF72* montrent des foci d'ARN intra-nucléaires (DeJesus-Hernandez et al., 2011) et des inclusions cytoplasmiques neuronales contenant la protéine séquestosome-1 (codées par le gène *SQSTM1*), distinctes des inclusions de TDP-43 qui sont également présentes chez ces individus (Al-Sarraj et al., 2011). Les cas de SLA porteurs de mutations sur les gènes *SOD1* ou *FUS* présentent

des inclusions de protéines SOD1 ou FUS anormales, respectivement, et non de TDP-43 (Farrarwell et al., 2015; Rademakers et al., 2010).

Une activation et une prolifération de cellules non neuronales, astrocytes et microglies sont également fréquentes dans la SLA (Hammer et al., 1979; Ince & Wharton, 2007; Nagy et al., 1994).

Néanmoins, les données histopathologiques, qui proviennent de tissus post-mortem de patients SLA au stade terminal de la maladie, ne permettent pas de comprendre comment et pourquoi les NMCS et les MnBS sont altérés à chaque stade clinique, depuis l'apparition des symptômes jusqu'au décès. Aussi, l'établissement de modèles animaux de SLA s'est avéré indispensable pour avoir accès à ces stades plus précoces et mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la SLA.

### 3. Modèles animaux

La découverte de gènes impliqués dans la SLA a conduit au développement de nombreux modèles animaux. Ces modèles récapitulent certains aspects de la maladie et sont utilisés pour améliorer notre connaissance sur les mécanismes physiopathologiques de cette pathologie et pour tester et mettre au point des molécules à potentiel thérapeutique.

#### 3.1 Modèles murins SOD1

La génération des premiers modèles animaux de SLA est venue de la découverte, en 1993, par Rosen et collaborateurs des mutations du gène *SOD1* associées à la maladie (Rosen et al., 1993). À ce jour, plusieurs modèles de rongeurs, principalement murins, exprimant une forme mutée du gène *SOD1* ont été générés (Tableau 4). La plupart de ces modèles sont des souris transgéniques qui surexpriment des formes mutées de la SOD1 humaine, mais il existe également des modèles de rats (Howland et al., 2002). Les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* furent les premières générées (Gurney et al., 1994) suivies par d'autres telles que *SOD1<sup>G85R</sup>* et *SOD1<sup>G37R</sup>*. Parallèlement, un autre modèle murin surexprimant une forme mutée du gène murin *Sod1* a été généré par Ripps et collaborateurs en 1995, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* où la glycine (G) en position 86 a été remplacée par l'arginine (R). Cette mutation est équivalente à la mutation *SOD1<sup>G85R</sup>* retrouvée chez certains patients (Ripps et al., 1995). C'est sur ce modèle que ces travaux de thèse ont été réalisés.

Ces différents modèles murins développent de façon similaire la plupart des symptômes de la SLA. Ces modèles diffèrent cependant au niveau de l'âge d'apparition des symptômes et de la vitesse de progression de la maladie, en fonction de l'origine murine ou humaine du gène muté, de la mutation, du niveau d'expression du transgène et du fond génétique (Alexander et al., 2004; Heiman-Patterson et al., 2011).

**Tableau 4: Principaux modèles murins transgéniques SOD1 de SLA**

| Mutation | Nature de l'enzyme | Référence           | Activité | Départ des symptômes (mois) | Survie (mois) | Paralyse | Perte de neurones moteurs |
|----------|--------------------|---------------------|----------|-----------------------------|---------------|----------|---------------------------|
| G93A     | <i>SOD1h</i>       | Gurney et al., 1994 | oui      | 3                           | 4             | oui      | MnS et NMCS               |
| G37R     | <i>SOD1h</i>       | Wong et al., 1995   | oui      | 3,5-6                       | 7             | oui      | MnS, NMCS (NE)            |
| G85R     | <i>SOD1h</i>       | Brujin et al., 1997 | non      | 8                           | 8,5           | oui      | MnS, NMCS (NE)            |
| G86R     | <i>Sod1m</i>       | Ripps et al., 1995  | non      | 2-3                         | 3             | oui      | MnS, NMCS (NE)            |

NE : non étudiée ; *SOD1h* : SOD1 humaine ; *Sod1m* : Sod1 murine ; SNC : système nerveux central (adapté (Philips & Rothstein, 2015)).

Bien que les souris *SODI*<sup>G93A</sup> soient le modèle le plus utilisé, les souris *SodI*<sup>G86R</sup> présentent des avantages par rapport à ce dernier. Tout d'abord, ces souris portent un nombre élevé de copies du gène *SodI* murin muté en position G86R et surexpriment la protéine murine SOD1, permettant d'éviter une toxicité (Ripps et al., 1995) liée à une différence inter-espèce, telle qu'elle pourrait être observée chez des souris surexprimant le gène humain *SOD1*. D'autre part, contrairement aux souris *SODI*<sup>G93A</sup> qui surexpriment une forme active de l'enzyme, la mutation G86R abolit l'activité de l'enzyme (Ripps et al., 1995) (Tableau 4), permettant de s'affranchir d'une toxicité liée à une augmentation de l'activité basale superoxyde dismutase.

Cette caractéristique a également comme avantage de permettre l'utilisation de souris sauvages comme contrôle des souris *SodI*<sup>G86R</sup>, contrairement aux souris *SODI*<sup>G93A</sup> qui, du fait de la surexpression d'une forme active de l'enzyme (Hayward et al., 2002), nécessitent d'utiliser un contrôle surexprimant une forme sauvage de l'enzyme SOD1. En outre, il a été montré que la surexpression de la forme sauvage humaine de l'enzyme est neurotoxique (Elroy-Stein et al., 1986) et que les souris contrôles qui surexpriment cette forme développent une axonopathie (Dal Canto & Gurney, 1994).

Jusqu'à l'âge de 75 jours environ, les souris *SodI*<sup>G86R</sup> sont présymptomatiques. Une perte de poids est observée à partir de 75 jours (Dupuis et al., 2004). Vers 80-90 jours, elles commencent à présenter les premiers symptômes moteurs modérés (altération de l'extension des pattes arrière, lorsque suspendues par la queue), ainsi qu'une altération des activités électriques spontanées caractéristique d'une dénervation (Figure 14), sans pour autant présenter de paralysie ni de perte des MnS. Les symptômes évoluent alors rapidement vers une paralysie des pattes arrière aux alentours de 95 jours, puis totale conduisant à la mort de l'animal entre 105 et 120 jours (Dupuis et al., 2000; Halter et al., 2010; Ripps et al., 1995).

D'un point de vue histopathologique, les souris *SodI*<sup>G86R</sup> se caractérisent par une atrophie musculaire, un démantèlement des JNM et une dégénérescence des fibres myélinisées dans le nerf sciatique (axones des MnS) (Dupuis et al., 2000; Ripps et al., 1995) (Figure 14D). Les travaux du laboratoire (INSERM U1118) suggèrent que le muscle jouerait un rôle important (potentiellement initiateur) dans la pathologie et que l'atteinte musculaire précéderait l'atteinte des MnS et conduirait à un démantèlement des JNM (Dupuis et al., 2002; Jokic et al., 2006). En effet, une altération du métabolisme énergétique et une modification de l'expression de gènes ont été observées précocement (stade présymptomatique) dans le muscle (Dupuis et al., 2003; Halter et al., 2010; Henriques, et al., 2015; Palamiuc et al., 2015).

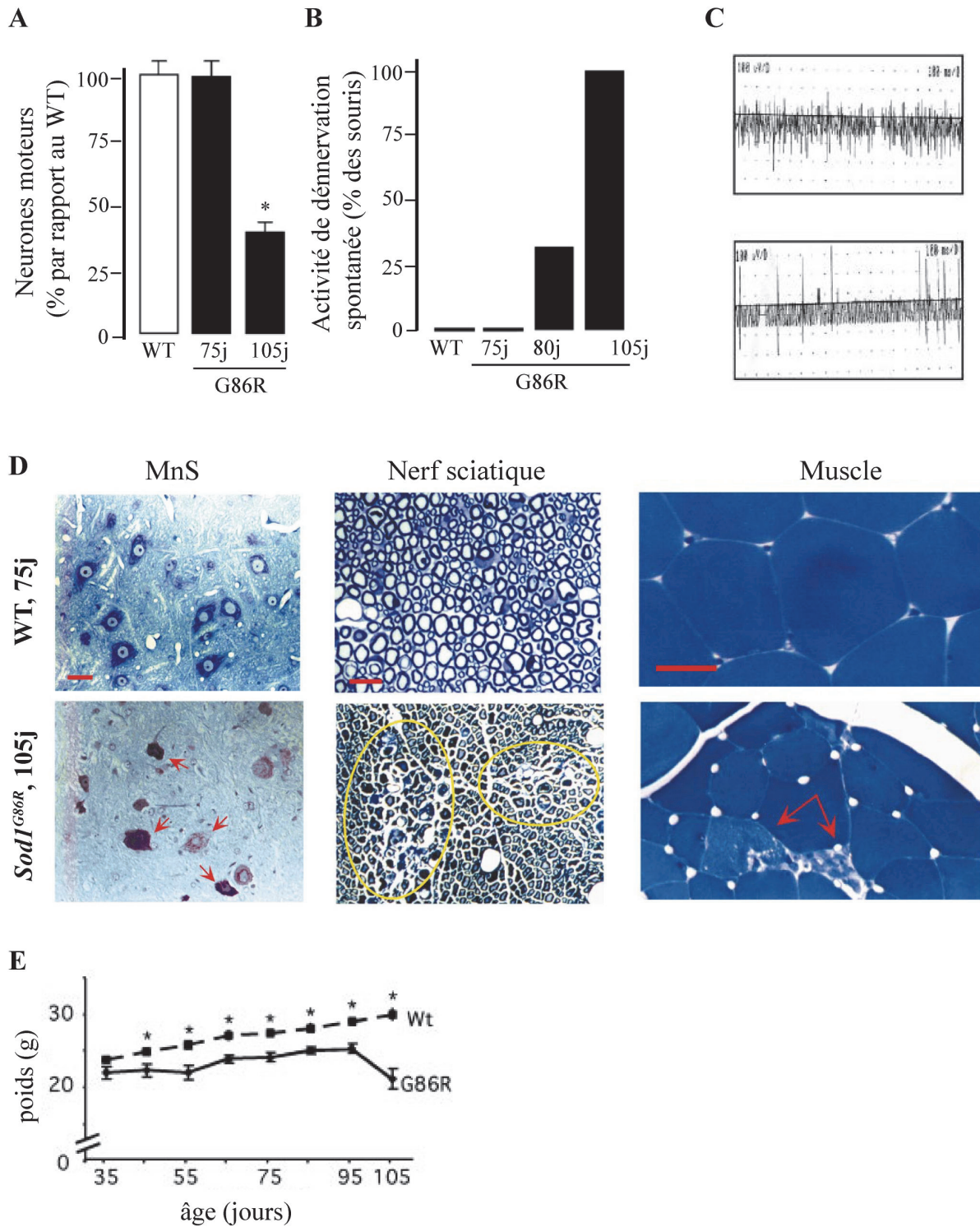


Figure 14. Caractérisation du modèle murin transgénique *Sod1*<sup>G86R</sup>

La lignée *Sod1*<sup>G86R</sup> se caractérise par une longue phase asymptomatique durant laquelle aucun déficit moteur évident n'est observé, de même qu'aucune altération histologique frappante (A-B-D, 75 jours). Aux alentours de 90 jours, les animaux développent les premiers symptômes : une perte de poids (E), une paralysie progressive débutant au niveau des pattes arrière (B-C) conduisant au décès de l'animal vers 105 jours. À 105 jours, les anomalies histopathologiques sont évidentes (105 jours), telles que la dégénérescence des MnS (A et D flèches rouge), un atrophie des fibres des nerfs sciatiques (D, cercle jaune) et une atrophie des fibres musculaires (D, flèches rouges) (adaptée de (Dupuis et al., 2000, 2004; Halter et al., 2010)).

Au stade final, ces souris se caractérisent par une diminution de la taille des MnS dans la corne ventrale de la moelle épinière suggérant une perte de cette population (Dupuis et al., 2000; Halter et al., 2010; Ripps et al., 1995; Rouaux et al., 2007) (Figure 14), ainsi qu'une perte d'interneurones calrétinine positifs, corrélés au début de la réaction astrocytaire et la présence d'inclusions avec des neurofilament phosphorylés (Morrison et al., 1998). Cependant, avant mes travaux de thèse, la dégénérescence des NMCS dans ce modèle murin n'avait pas été vérifiée.

Les différents modèles murins *SOD1* présentent des altérations histologiques relativement similaires. Il existe néanmoins quelques différences concernant la réaction gliale. Les modèles *SOD1<sup>G85R</sup>* et *SOD1<sup>G37R</sup>* présentent une réaction gliale présymptomatique contrairement aux souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *SOD1<sup>G93A</sup>* qui n'en présentent pas avant le début des symptômes (Morrison et al., 1998). De même, la présence de vacuoles intra-cytoplasmiques est observée au stade présymptomatique chez les souris les *SOD1<sup>G37R</sup>* et *SOD1<sup>G93A</sup>* contrairement aux souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et aucune vacuole n'est observée chez les souris *SOD1<sup>G85R</sup>* (Morrison et al., 1998). Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, l'altération des JNM semble se produire avant la dégénérescence des MnS (Fischer et al., 2004). Enfin, une diminution de la taille et une perte des NMCS dès les stades présymptomatiques ont été mises en évidence chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* et *SOD1<sup>G93A/G1H</sup>* (Leichsenring et al., 2006; Ozdinler et al., 2011; Zang & Cheema, 2002).

D'autre part, des études menées chez des modèles murins de *SOD1* ont montré des dysfonctionnements moléculaires dès le développement embryonnaire, tels qu'une hyperexcitabilité neuronale (van Zundert et al., 2008; Williamson & Cleveland, 1999). Cela laisse supposer que la maladie pourrait commencer tôt dans la vie d'un point de vue biologique, mais ne devenir cliniquement apparente que beaucoup plus tard.

### 3.2 Autres modèles murins

L'identification des mutations dans les gènes codant pour *TDP-43* (pour revue, voir (Tsao et al., 2012)), *FUS* (Scekic-Zahirovic et al., 2016, 2017) et *C9ORF72* (Chew et al., 2015; Liu et al., 2016) a permis le développement de nouveaux modèles transgéniques. Bien que ces modèles restent encore peu caractérisés, par rapport aux modèles *SOD1*, certains ont montré des caractéristiques typiques des patients SLA.

Parmi les différents modèles *TDP-43* générés, le modèle développé par Wegorzewska et ses collègues surexprime le gène mutant *TDP-43<sup>A315T</sup>* sous contrôle du promoteur prion (souris Prp-*TDP-43<sup>A315T</sup>*). Ces animaux présentent une perte des neurones de la couche V du cortex moteur, une perte des MnS et une atrophie musculaire. Des agrégats de protéines ubiquitinylées cytoplasmiques sont observés dans les neurones pyramidaux de la couche V du cortex (moteur et frontal) et des MnS (Wegorzewska et al., 2009).

Au sein du laboratoire (INSERM U1118), Luc Dupuis et son équipe ont généré un modèle murin knock-in de *FUS*, permettant l'expression d'une forme tronquée de la protéine FUS (Scekic-Zahirovic et al., 2017). Ces souris présentent un phénotype moteur léger, des inclusions cytoplasmiques de FUS et d'ubiquitine dans les MnS ainsi qu'une perte des MnS (Scekic-Zahirovic et al., 2017).

Enfin, Liu et ses collègues ont récemment développé un modèle murin de SLA / DFT, les souris BAC *C9orf72*, présentant les caractéristiques phénotypiques et moléculaires observées chez ces patients : une paralysie progressive accompagnée d'une dégénérescence des larges neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur et des MnS, ainsi qu'une dénervation des JNM (Liu et al., 2016).

Ces nouveaux modèles, très prometteurs, nécessitent encore une meilleure caractérisation, notamment en ce qui concerne la perte des NMCS, à l'instar de ce qui a été commencé avec les modèles *SOD1*.

## 4. Mécanismes physiopathologiques

L'étude des modèles animaux, surtout des lignées de souris porteuses de mutations *SOD1*, a permis d'améliorer notre compréhension des processus physiopathologiques de la SLA. Ceux-ci incluent le stress oxydant, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress du réticulum endoplasmique, l'altération du métabolisme des ARN, l'agrégation des protéines, une altération de l'autophagie et du transport axonal, l'implication de cellules non neuronales et l'excitotoxicité (Figure 15). Tous ces mécanismes ont été décrits principalement dans la moelle épinière et pour les MnS. À l'heure actuelle, on ne sait pas s'ils affectent également les NMCS.

### 4.1 Stress oxydant

Le stress oxydant résulte du déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène, les radicaux libres, et la capacité du système biologique à les éliminer ou à réparer les dommages induits par ces espèces toxiques. Comme indiqué précédemment, l'enzyme SOD1 est une protéine antioxydante impliquée dans la détoxification cellulaire permettant ainsi l'élimination des radicaux libres. L'identification de mutations sur le gène codant cette enzyme a conduit à considérer le stress oxydant comme facteur étiologique potentiel de la SLA.

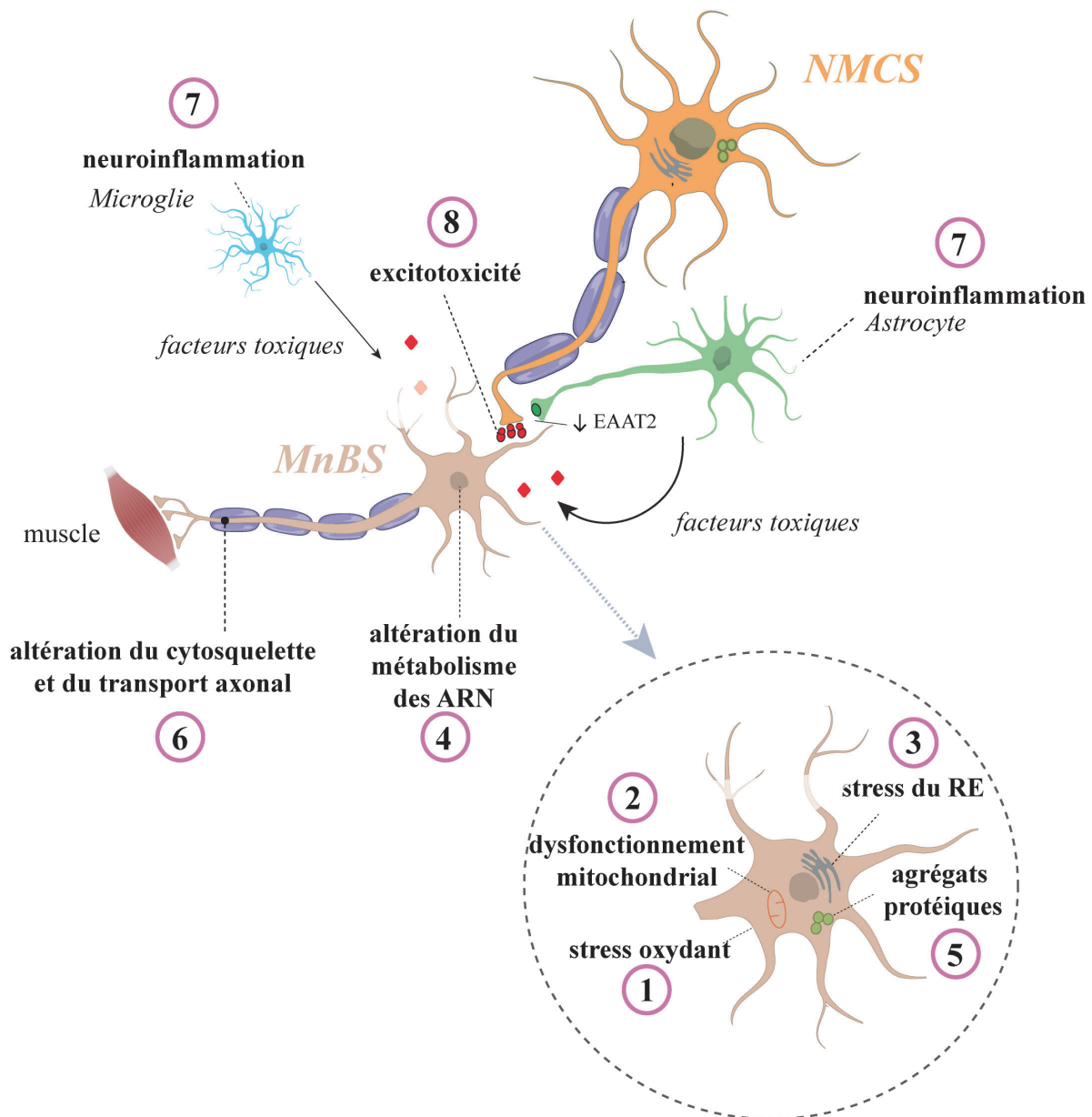


Figure 15. Mécanismes physiopathologiques identifiés comme étant impliqués dans la SLA

Les mécanismes physiopathologiques identifiés comme impliqués dans la SLA ont été décrits principalement dans la moelle épinière et pour les MnS. Ils incluent le stress oxydant (1), le dysfonctionnement mitochondrial (2), le stress du réticulum endoplasmique (3), l'altération du métabolisme des ARN (4), l'agrégation des protéines (5), une altération du cytosquelette et du transport axonal (6), la neuroinflammation (7) et l'excitotoxicité (8) (adaptée de (Taylor et al., 2016)).



Différentes hypothèses pouvant expliquer les mécanismes de toxicité de la protéine SOD1 mutante ont été proposées. Les premières hypothèses initialement basées sur une altération de l'activité dismutase incluent : (1) la perte de la fonction dismutase conduisant à une augmentation de radicaux superoxydes (Beckman et al., 1993; Deng et al., 1993); (2) un mécanisme dominant négatif par lequel la protéine SOD1 mutante, inactive, inhiberait la fonction de la protéine SOD1 non mutée (Rosen et al., 1993); ou (3) une augmentation de l'activité SOD1 conduisant à des niveaux accrus de peroxyde d'hydrogène et de radicaux hydroxyles (Rosen et al., 1993). Cependant, des recherches ultérieures ont révélé que les mécanismes de la toxicité des mutants SOD1 ne sont pas si simples. En effet, il a été montré que d'autres souris exprimant des mutants de SOD1 qui conservent une activité dismutase complète, comme la mutation G93A, développent la SLA (Hayward et al., 2002). De plus, les souris dont le gène *Sod1* a été invalidé ne développent pas de SLA (Reaume et al., 1996). Ainsi, il est maintenant proposé que les mutations *SOD1* confèrent à l'enzyme une toxicité par un gain de fonction d'origine inconnue. De nouvelles hypothèses ont alors émergé. Il a été proposé que les mutations pourraient induire une altération de la structure de l'enzyme, entraînant une instabilité conformationnelle et un mauvais repliement, ou encore des activités catalytiques aberrantes (Araki et al., 2012; Museth et al., 2009; Perry et al., 2010).

L'analyse du sérum des patients atteints de SLAf et SLAs a montré une augmentation de marqueurs de dommages due aux radicaux libres (Mitsumoto et al., 2008; Simpson et al., 2004). Des niveaux élevés de dommages oxydatifs ont été rapportés sur des protéines (Shaw, Ince, et al., 1995), des lipides (Simpson et al., 2004), de l'ADN (Bogdanov et al., 2000) et de l'ARN (Chang et al., 2008) dans des tissus de patients atteints de SLA.

Dans les modèles murins *SOD1*, il a été montré que l'oxydation des ARNm est un événement précoce et que certains ARNm sont plus susceptibles à l'oxydation, notamment ceux impliqués dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, la biosynthèse, le repliement et de dégradation des protéines, la myélinisation et le cytosquelette (Chang et al., 2008). Ainsi, il apparaît que le stress oxydant interagit avec d'autres processus physiopathologiques impliqués dans la mort des motoneurones et décrits ci-dessous.

### 4.2 Dysfonctionnement mitochondrial

Les mitochondries sont des organites cellulaires responsables de la production d'ATP, la maintenance de l'homéostasie du calcium et la régulation intrinsèque de l'apoptose.

De nombreuses preuves indiquent un dysfonctionnement mitochondrial dans la SLA (pour revue, voir (Faes & Callewaert, 2011)). Des anomalies structurelles et morphologiques mitochondriales dans le muscle squelettique, les MnS et le cortex moteur ont d'abord été identifiés chez des patients atteints de SLA (Hirano et al., 1984; Sasaki & Iwata, 1999; Wiedemann et al.,

1998). Ces observations ont été retrouvées chez les modèles murins *SOD1*, où il a été observé des mitochondries agrégées, vacuolées, fragmentées ou gonflées dès les stades présymptomatiques (Dal Canto & Gurney, 1994; Jaarsma et al., 2001; Kong & Xu, 1998). Ces changements morphologiques sont associés à des dysfonctionnements mitochondriaux. Des changements dans l'activité des différents complexes de la chaîne de transfert d'électrons ont été décrits chez les patients atteints de SLA et dans des modèles murins *SOD1* (Coussee et al., 2011; Mattiazzi et al., 2002; Wiedemann et al., 1998, 2002).

Bien que le mécanisme exact par lequel l'enzyme SOD1 mutée perturbe la fonction mitochondriale n'est pas complètement établi, quelques explications ont été proposées. Chez la souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, il a été montré que la protéine SOD1 mutée s'accumule dans l'espace intermembranaire mitochondrial et empêche l'importation de protéines mitochondriales (Liu et al., 2004; Wong et al., 1995). Les mitochondries sont importantes dans le contrôle de l'apoptose puisqu'elles libèrent le cytochrome c de l'espace intermembranaire permettant l'activation des caspases. Les agrégats de la protéine SOD1 mutée peuvent donc interagir avec des éléments anti-apoptotiques mitochondriaux provoquant ainsi une activation anormale de l'apoptose par la libération du cytochrome c dans le cytoplasme (voir partie III.4.9 ; (Pasinelli et al., 2004)).

D'autre part, une altération de la capacité de régulation de la concentration en calcium par la mitochondrie dans le cerveau et la moelle épinière de souris *SOD1<sup>G93A</sup>* a été observée au stade présymptomatique (Damiano et al., 2006). Cette altération peut rendre les motoneurones plus susceptibles à l'augmentation intracellulaire de calcium liée à l'excitotoxicité glutamatergique (voir partie III.4.8).

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le dysfonctionnement mitochondrial, observé avant la perte des MnS, pourrait être un facteur important de la perte de cette population neuronale et de la pathogenèse de la SLA.

### 4.3 Stress du réticulum endoplasmique

Le RE est le site de synthèse, de repliement et de transport de lipides et de protéines membranaires ou sécrétées, et également un lieu de stockage du calcium. Physiologiquement, l'accumulation de protéines mal repliées provoque le stress du RE. Il peut également être induit par une perturbation de l'homéostasie calcique, du fait que le repliement protéique est fortement dépendant du calcium. Ce stress induit une réponse appelée réponse UPR (*unfolded protein response*), induite par des senseurs transmembranaires du RE. Celle-ci a pour fonction de ralentir temporairement l'arrivée de nouvelles protéines dans le RE, d'augmenter les capacités de repliement de l'organite en stimulant la synthèse de protéines chaperonnes, et d'accroître la dégradation des protéines mal repliées. Bien que ces mécanismes soient initialement

cytoprotecteurs, l'activation prolongée de la réponse UPR due à une incapacité à restaurer l'homéostasie du RE peut déclencher un processus apoptotique (Kaufman, 2002).

Des altérations morphologiques du RE ont été observées dans la moelle épinière de patients SLA (Oyanagi et al., 2008) et des souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Dal Canto & Gurney, 1994), correspondant à une dilatation, une fragmentation et un détachement des ribosomes. Les études de ces modèles murins ont montré que les mutations de la protéine SOD1 provoquent une mauvaise conformation de l'enzyme, sa rétention dans le RE et la formation d'agrégats (Kikuchi et al., 2006; Tobisawa et al., 2003). Il a été également montré que cette enzyme interagit avec des protéines chaperonnes de la réponse UPR, telle que Derline-1 qui est impliquée dans la voie de dégradation protéique. L'inhibition de cette voie entraîne une accumulation de protéines mal repliées dans le RE, le stress du RE et l'apoptose cellulaire (Nishitoh et al., 2008).

La réponse UPR est déclenchée par l'activation de trois senseurs protéiques, IRE1 (*iron regulatory element 1*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) et PERK (*PRKR-like ER kinase*). Une augmentation de marqueurs de cette réponse UPR, dont ces trois protéines précédemment citées, est observée dans la moelle épinière des patients SLA (Atkin et al., 2008) et des souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Atkin et al., 2006; Kikuchi et al., 2006; Saxena et al., 2009).

Dans l'ensemble, ces données suggèrent une contribution de la protéine SOD1 mutée dans l'établissement du stress du RE et de la réponse UPR et une implication de ces mécanismes dans la mort des MnS et la pathogenèse de la SLA.

#### 4.4 Altération du métabolisme des ARN

L'altération du métabolisme des ARN est suspectée depuis la découverte de mutations sur les gènes codant pour TDP-43 et FUS, des protéines de liaison à l'ARN et à l'ADN essentiellement nucléaires impliquées dans de multiples aspects du métabolisme de l'ARN (Lagier-Tourenne et al., 2012). Les mutations sur les gènes *TARDBP* et *FUS* en condition de SLA conduisent à la redistribution de ces protéines vers le cytosquelette (Kwiatkowski et al., 2009; Neumann et al., 2006; Scekcic-Zahirovic et al., 2016, 2017; Vance et al., 2009), où elles s'accumulent sous forme de granules de stress (Mackenzie et al., 2010). Cette redistribution a pour conséquence un appauvrissement de protéines de liaison à l'ARN dans le noyau et pourrait être à l'origine d'une perte considérable de leurs fonctions nucléaires.

Par ailleurs, chez la souris et dans des neurones humains différenciés à partir de cellules pluripotentes, la réduction de l'expression de TDP-43 ou de FUS a été associée à une modification de l'expression et de l'épissage de plusieurs centaines de gènes (Lagier-Tourenne et al., 2012; Polymenidou et al., 2011). Ces études ont montré que les deux protéines sont fortement impliquées dans le traitement de pré-ARNm contenant de longues séquences introniques, dont certains sont des

cibles communes aux deux protéines (Lagier-Tourenne et al., 2012; Polymenidou et al., 2011). Les mécanismes par lesquels ces protéines conduisent à la pathogenèse de la maladie (perte de fonction nucléaire et/ou gain de fonction cytosolique) sont en cours d'étude. Récemment, une étude a été menée sur le modèle murin exprimant une forme tronquée de la protéine FUS qui conduit à sa redistribution cytoplasmique. Des altérations d'expression et d'épissage d'ARNm en accord avec le phénotype lié à une perte de fonction nucléaire de FUS ont été observées (Scekic-Zahirovic et al., 2016).

Dans les cas de mutations *SOD1*, un mécanisme d'altération du métabolisme des ARN impliquant le stress oxydatif a été proposé. Comme vu précédemment, une oxydation des ARNm est détectée à des stades précoces chez des patients SLA et des souris transgéniques *SOD1* et est associée à une baisse du niveau protéique (Shaw et al, 1995, Chang et al, 2008). En effet, il a été montré qu'une oxydation des ARNm peut entraîner un décrochage des ribosomes conduisant à une diminution du niveau protéique (Shan et al., 2007) et peut induire des erreurs de traduction conduisant à la production de courtes séquences polypeptidiques (Tanaka et al., 2007).

Ainsi, ces études montrent que le métabolisme des ARN joue un rôle central dans la survie des MnS et serait impliqué dans la pathogenèse de la SLA.

### 4.5 Formation d'agrégats protéiques

Comme évoqué précédemment (partie III.2), l'analyse post-mortem de tissus de patients atteints de SLA a permis la mise en évidence de divers types d'agrégats protéiques dans la moelle épinière et différentes régions du cerveau telles que le cortex moteur, frontal et temporal, l'hippocampe et le cervelet (Al-Chalabi et al., 2012; Brettschneider et al., 2013). Ces inclusions contiennent des protéines différentes dont certaines d'entre elles s'agrègent après mutation (telles que *SOD1*, *TDP-43*, *FUS*), tandis que d'autres peuvent se retrouver simplement piégées dans ces agrégats (telles que *Bcl-2*, *HSP70*) (Pasinelli et al., 2004; Watanabe et al., 2001).

Les inclusions les plus fréquemment observées sont des inclusions ubiquitinylées. Elles sont présentes dans les MnBS (Matsumoto et al., 1993) et dans le TCS des patients SLA (Sasaki & Maruyama, 1994), et sont également retrouvées dans le cortex frontal et temporal de patients atteints de SLA-DFT (Neumann et al., 2006). La plupart des cas de SLA présentent également des corps de Bunina (Okamoto et al., 2008). De plus, des agrégats riches en hyaline et en neurofilaments sont également retrouvés dans les MnS des souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Zhang et al., 1997).

D'autre part, l'un des principaux constituants protéiques des inclusions ubiquitinylées dans la SLA est la forme phosphorylée de la protéine *TDP-43*. Les agrégats *TDP-43* phosphorylés sont présents dans le cytoplasme de cellules neuronales et gliales de la majorité des cas de SLA (Mackenzie et al., 2007; Neumann et al., 2006).

Cependant, la contribution de ces agrégats à la toxicité des motoneurons n'est pas encore clairement établie. En effet, il reste à déterminer si ces inclusions sont : 1) responsables de la toxicité cellulaire, 2) de simples produits inoffensifs de la neurodégénérescence ou 3) bénéfiques pour la cellule en ce qu'elles permettent de séquestrer des protéines anormales et potentiellement toxiques. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer comment les agrégats de SOD1 pourraient produire une toxicité cellulaire. La première est un effet néfaste sur la machinerie de dégradation protéique et notamment les voies du protéasome et de l'autophagie (Chen et al., 2012; Kabashi et al., 2004). D'autre part, ces agrégats pourraient séquestrer d'autres protéines importantes au bon fonctionnement de la cellule, telles que la forme sauvage de la protéine SOD1. En effet, des agrégats de protéine SOD1 sauvage ont été observés dans la moelle épinière de patients atteints de SLAs (Guzman et al., 2007) et proviendraient de l'oxydation initiale de la protéine (Ezzi et al., 2007). Cette oxydation en affectant son bon repliement la rendrait propice à l'agrégation et potentiellement toxique pour les motoneurons (Rakhit et al., 2002), notamment via une altération du transport axonal (Bosco et al., 2010).

Ainsi, si la présence d'agrégats protéiques est observée chez les patients SLA, leur rôle dans la pathogenèse de la maladie n'est pas encore clairement établi. En effet, il n'a pas encore été déterminé si ces agrégats sont toxiques ou bénéfiques pour les neurones et s'ils sont une cause ou une conséquence de la neurodégénérescence.

### **4.6 Altération de l'autophagie**

L'autophagie est un mécanisme cellulaire qui permet l'élimination des protéines mal repliées et d'organites protégeant ainsi la cellule de composés toxiques pouvant induire une mort cellulaire (Cipolat Mis et al., 2016). Lors de ce processus, les composés toxiques vont se retrouver piégés dans un autophagosome qui va ensuite fusionner avec un lysosome, formant un autolysosome, afin de permettre leur dégradation.

Une dérégulation de l'autophagie est observée dans les MnS des patients et des modèles animaux de la maladie (Morimoto et al., 2007; Song et al., 2012). En effet, une augmentation de marqueurs d'autophagie a été observée dans les échantillons post-mortem de moelle épinière de patients (Sasaki, 2011) ainsi que dans les modèles animaux de la maladie (Li et al., 2008) suggérant ainsi une activation de ce mécanisme. Des inclusions cytoplasmiques de marqueurs typiques de l'autophagie, LC3-II et P62/SQSTM1, ont par ailleurs été retrouvées dans les MnS de patients SLAs suggérant une activation et une altération de ce mécanisme (Sasaki, 2011). Une accumulation anormale de marqueurs protéiques de l'autophagosome a été retrouvée chez les patients SLA, suggérant une altération de la fusion finale avec les lysosomes (Tresse et al., 2010), et par conséquent une absence d'élimination des agrégats protéiques qui caractérise la SLA (Neumann et

al., 2006). La fusion entre l'autophagosome et le lysosome étant dépendante du transport axonal, il a été suggéré que l'altération de ce transport observé chez les souris *SOD1*<sup>G93A</sup> pourrait être responsable de cette accumulation d'autophagosomes ainsi que des défauts de fusion entre l'autophagosome et le lysosome (Nixon, 2007).

Bien que le lien entre l'autophagie et la mort des MnS n'ait pas encore été établi, des études ont montré un rôle bénéfique de l'augmentation de l'autophagie dans les modèles murins (Crippa, Carra, et al., 2010). Ainsi, la dérégulation de ce système autophagique pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de la SLA.

### 4.7 Altération du cytosquelette et du transport axonal

Les NMCS et MnBS sont des cellules fortement polarisées avec des axones pouvant atteindre plus d'un mètre de longueur. Par ces caractéristiques, ces neurones sont fortement dépendants du transport axonal. Le transport antérograde, du corps cellulaire vers les synapses permet de fournir des composants synthétisés dans leur corps cellulaire (ARN, protéines et organites). Le transport rétrograde, des synapses vers le corps cellulaire, permet quant à lui de transporter des substances essentielles à la croissance et la survie neuronale (facteurs neurotrophiques). Le cytosquelette est constitué de microtubules, de neurofilaments et de filaments intermédiaires, ainsi que les protéines motrices, les kinésines et les dynéines qui sont essentiels pour le maintien de l'architecture de l'axone et le bon fonctionnement des transports.

La désorganisation du cytosquelette axonal, et en particulier des neurofilaments, est une autre caractéristique de la SLA. Des mutations rares ont été identifiées dans les gènes codants pour les neurofilaments à chaîne lourde (Al-Chalabi et al., 1999) et la périphérine (Corrado et al., 2011). Ces deux protéines ont été observées dans des inclusions cytoplasmiques intraneuronales chez les patients et les souris *SOD1*<sup>G93A</sup> (Corbo & Hays, 1992). Une réduction des ARNm de la sous-unité légère des neurofilaments a été également observée dans la moelle épinière de patients (Wong et al., 2000).

D'autre part, dans le modèle murin *SOD1*, une altération du transport axonal est observée (Zhang et al., 1997). Chez les souris *Sod1*<sup>G86R</sup>, il a été noté une augmentation de l'expression de KIFAP 3 (*kinesin-associated protein 3*) une kinésine impliquée dans le transport antérograde, protéine dont l'expression réduite chez des patients atteints de SLAs a été corrélée à une augmentation de leur survie (Dupuis et al., 2000; Landers et al., 2009). En outre, l'introduction d'une mutation sur le gène codant la dynactine chez les souris (un activateur de la protéine dynéine impliquée dans le transport rétrograde) provoque des défauts de transport axonal associés à une mort des MnS (Laird et al., 2008).

Par ailleurs, le transport approprié des granules de transport d'ARN et d'autres facteurs par les microtubules est régulé par plusieurs protéines de liaison à l'ARN, dont certaines ont été mises en cause dans le contexte de la SLA, comme TDP-43. Il a été montré que des mutations de *TARDBP* nuisent au transport axonal des granules d'ARN chez la drosophile et dans les cultures de motoneurones dérivés de personnes atteintes de SLA (Alami et al., 2014).

D'après ces données, il semble donc que des altérations du cytosquelette et des perturbations du transport axonal contribuent à la pathogenèse de la SLA. Une des hypothèses de susceptibilité des NMCS et MnBS s'appuie sur ces données et suggère que ces neurones, du fait de leurs projections axonales particulièrement longues, seraient d'autant plus affectés par les altérations du transport axonal.

### 4.8 Neuroinflammation

La neuroinflammation se caractérise par une activation des cellules gliales résidentes, astrocytes et microglies, et l'invasion du SNC par des lymphocytes T. Il est maintenant admis que la SLA se manifeste en partie par un mécanisme « cellulaire non-autonome », c'est-à-dire que la maladie est le résultat d'une combinaison de dommages causés au sein des motoneurones et des cellules environnantes gliales. Ce concept est né d'études réalisées chez les souris transgéniques *SOD1* résumées ci-dessous.

#### 4.8.1 Rôle des cellules gliales

En 1997, Bruijn et ses collègues ont montré que les astrocytes, présentant des agrégats de la protéine SOD1 mutée, sont fortement activés chez ces souris (Bruijn et al., 1998) ce qui suggère une contribution des cellules gliales à la pathogenèse de la maladie. Cependant, la surexpression de la protéine SOD1 mutée sélectivement dans les astrocytes conduit à une réaction astrocytaire sans dégénérescence des MnS (Gong et al., 2000), indiquant que l'expression de la SOD1 mutée dans les MnS est nécessaire pour déclencher la maladie. D'autre part, il a été montré que la délétion de la protéine SOD1 mutée sélectivement dans les astrocytes (Yamanaka et al., 2008) ou les microglies (Boillée et al., 2006) prolonge la survie des souris, sans pour autant retarder le déclenchement de la maladie. Ces résultats confirment l'étude de Clément et collaborateurs qui, par le biais de souris chimères, ont montré que la survie des souris exprimant la protéine SOD1<sup>G93A</sup> dans les MnS est augmentée lorsqu'ils sont entourés de cellules non neuronales sauvages (Clement et al., 2003). À l'inverse, la délétion de la protéine SOD1 mutée sélectivement dans les motoneurones retarde le déclenchement de la maladie, mais ne ralentit pas la vitesse de progression lorsque la maladie est initiée (Boillée et al., 2006; Ralph et al., 2005; Yamanaka et al., 2008).

Les oligodendrocytes forment la gaine de myéline autour des axones des neurones centraux. Ils contribuent également à la fonction des neurones en fournissant du lactate, un

métabolite énergétique, via le transporteur MCT1 (*Monocarboxylate transporter 1*). Il a été montré qu'une réduction de la synthèse de la protéine SOD1 mutée au début de la maturation des oligodendrocytes produit un retard d'apparition de la maladie plus important que lorsqu'une suppression similaire est effectuée seulement dans les motoneurones (Kang et al., 2013; Yamanaka et al., 2008). Par ailleurs, les patients SLAs présentent une réduction de l'expression de MCT1, qui est retrouvée chez les souris *SOD1* (Lee et al., 2012).

Dans leur ensemble, ces résultats démontrent que la survie des motoneurones dépend à la fois de mécanismes intrinsèques et extrinsèques qui mettent en évidence un rôle des différents sous-types de cellules gliales.

### 4.8.2 Réaction neuroinflammatoire

Les microglies sont les cellules immunitaires innées qui constituent la première ligne de défense contre des infections ou des dommages du SNC. Les microglies activées libèrent toute une gamme de cytokines et de chemokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. Lors de la réponse microgliale, les microglies, à l'état activé « M1 », libèrent d'abord des facteurs pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  ; IL-1 $\beta$ , *interferon-1 $\beta$*  ; NO, *Nitric oxid* ; IFN- $\gamma$ , *interferon  $\gamma$* ) pour éliminer ou limiter les dommages. Lorsqu'elles passent à l'état activé « M2 », elles libèrent alors des facteurs anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10, interleukines 4 et 10 ; IGF-1, *insuline growth factor 1*) pour réparer les dommages (Philips & Rothstein, 2015). Par ailleurs, les microglies fonctionnent en étroite interaction avec les lymphocytes T inflammatoires ainsi qu'avec les astrocytes dans la médiation de cette réponse inflammatoire.

Comme il a été mentionné dans la partie 2 de ce chapitre, une réaction microgliale (ou microgliose) a été identifiée dans le cortex et la moelle épinière des patients et des modèles murins *SOD1* (Alexianu et al., 2001; Alshikho et al., 2016; Brettschneider et al., 2012; Corcia et al., 2012; Henkel et al., 2004, 2006; Hensley et al., 2003; Kawamata et al., 1992; McGeer & McGeer, 2002; Meissner et al., 2010; Nguyen et al., 2001; Poloni et al., 2000; Sasaki & Maruyama, 1994; Troost et al., 1992; Turner et al., 2004; Zürcher et al., 2015). En effet, il a été observé une surexpression de marqueurs microgliaux, tels que CD11b (ou Itgam, *Integrin alpha M*) et Iba1 (ou Aif1, *allograft inflammatory factor 1*), ainsi qu'une surexpression de marqueurs associés à la présentation antigénique comme ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*), permettant le recrutement des lymphocytes T inflammatoires par les cellules microgliales (Alexianu et al., 2001; Corcia et al., 2012; Henkel et al., 2004, 2006; Turner et al., 2004). De même, il a été observé une augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que la protéine MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) ainsi que de chemokines par les microglies (Henkel et al., 2004, 2006; Hensley et al., 2003; Meissner et al., 2010; Nguyen et al., 2001; Poloni et al., 2000).



Dans les modèles animaux *SOD1<sup>G93A</sup>*, l'augmentation de la microglie est observée très peu de temps après la dénervation des JNM dans la corne ventrale de la moelle épinière (Alexianu et al., 2001). Au niveau du cortex cérébral, une activation microgliale a été observée à proximité des dendrites apicales des NMCS (Jara et al., 2012, 2017; Ozdinler et al., 2011), ainsi que chez les patients SLA (Jara et al., 2017). Cette microglie surviendrait précocement dans le cortex moteur de ces souris (Jara et al., 2017).

Les astrocytes sont impliqués dans l'homéostasie ionique, le recyclage des neurotransmetteurs et le soutien métabolique aux neurones environnants. Comme la microglie, la fonction des astrocytes est fortement influencée par les lymphocytes T, les neurones et éventuellement les oligodendrocytes. Face à des dommages environnants, les astrocytes réagissent suivant un processus appelé astrogliose, en augmentant l'expression de certains marqueurs tels que GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) et ALDH1L1 (*aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1*) et en produisant des signaux inflammatoires.

Dans le cerveau des patients atteints de SLA, l'astrogliose est observée à la fois dans la substance grise et dans la substance blanche et n'est pas limitée au cortex moteur (Kushner et al., 1991; Nagy et al., 1994). Dans la moelle épinière, une astrogliose accrue est observée dans la corne ventrale et dorsale (Schiffer et al., 1996).

De même chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, une astrogliose a été observée dans la moelle épinière (Levine et al., 1999) et s'accentuerait avec la progression de la maladie (Keller et al., 2009). Une astrogliose a également été observée à proximité des dendrites apicales des NMCS (Jara et al., 2012; Ozdinler et al., 2011). D'autre part, il a été montré que les astrocytes sécrètent des médiateurs inflammatoires (tels que NGF, *nerve growth factor*) pouvant être toxiques pour les motoneurones (Pehar et al., 2004).

Bien que ces données montrent une activation des astrocytes et des microglies dans la SLA, leur contribution dans la pathogenèse reste encore à éclaircir. Il n'a pas encore été clairement déterminé si les astrocytes et les microglies contribuent à la dégénérescence des neurones moteurs ou s'ils sont le résultat de la mort neuronale.

### 4.9 Excitotoxicité

Le glutamate, principal neurotransmetteur exciteur du SNC, permet la communication entre les NMCS et les MnBS via l'activation des récepteurs AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid*) et NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) (Simeone et al., 2004). Après sa libération dans la fente synaptique, l'excès de glutamate est capturé par les transporteurs de glutamate EAAT2 (GLT-1 chez les rongeurs) et EAAT1 (GLAST chez les rongeurs) exprimés par les astrocytes, empêchant ainsi une stimulation post-synaptique excessive (Vandenberg, 1998).

L'excitotoxicité est un processus pathologique résultant de l'activation excessive des récepteurs au glutamate et aboutissant à une altération neuronale. Elle peut être due à une augmentation du relargage de glutamate, une diminution de sa recapture ou une augmentation de la sensibilité post-synaptique. Cette activation excessive induit une entrée massive de calcium dans le neurone entraînant des dommages, via l'activation de protéases, de lipases et de nucléases calcium-dépendantes et conduit à la mort neuronale (pour revue voir (Heath & Shaw, 2002)).

L'excitotoxicité est étroitement liée à d'autres caractéristiques importantes de la SLA, telles que la perturbation du sodium et du calcium intracellulaire, l'activation d'enzymes protéolytiques et génératrices d'espèces réactives de l'oxygène, des anomalies mitochondriales et du déséquilibre énergétique (Arundine & Tymianski, 2003). De nombreuses études soutiennent le rôle important de l'excitotoxicité dans la physiopathologie de la SLA (Heath & Shaw, 2002; Van Den Bosch et al., 2006). En particulier, des taux très élevés de glutamate dans le liquide céphalo-rachidien des patients SLA ont été observés (Perry et al., 1990; Shaw, Forrest, et al., 1995). Celui-ci résulterait, tout au moins en partie, d'une diminution de la recapture du glutamate par les astrocytes. En effet, une altération du transport de glutamate via le récepteur EEAT2 astrocytaire a été identifiée dans le cortex moteur et la moelle épinière des patients atteints de SLA (Bristol & Rothstein, 1996), et une perte de ce récepteur a également été observée dans les modèles murins *SOD1* (Howland et al., 2002; Trotti et al., 1999) (Figure 15).

L'activation excessive des récepteurs AMPA et NMDA est considérée comme l'une des principales causes d'excitotoxicité, dont les effets néfastes sont principalement médiés par les voies dépendantes du calcium (Grosskreutz et al., 2010). Des études *in vitro* ont montré que les MnBS sont particulièrement vulnérables à l'excitotoxicité médiée par le récepteur NMDA (Sanelli et al., 2007) et AMPA (Carriedo et al., 1996). Une diminution des sous-unités GluR2 des récepteurs AMPA (Williams et al., 1997) ainsi qu'un défaut de modification post-transcriptionnelle de l'ARNm de ces sous-unités GluR2 (Kawahara et al., 2004) ont été observés dans les motoneurons de la moelle épinière de patients. Ces modifications post-transcriptionnelles rendent le récepteur AMPA très perméable au calcium (Kwak et al., 2010; Williams et al., 1997), et les neurones qui les expriment particulièrement vulnérables.

Enfin, la protéine SOD1 mutée pourrait modifier directement l'homéostasie du calcium. En effet, Allen et ses collaborateurs (2011) ont montré que des agrégats de protéines SOD1 mutées formeraient des pores membranaires présentant une conductance aux ions. Ces pores qui rendent les membranes perméables au flux d'ions conduiraient à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Allen et al., 2012). Cette découverte suggère que la protéine SOD1 mutée peut contribuer aux dommages excitotoxiques des motoneurons sans contribution glutamatergique.

Ainsi, l'excitotoxicité pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse de la SLA et contribuer au dysfonctionnement des NMCS et des MnBS au cours de la maladie.

### 4.10 Apoptose neuronale

L'apoptose est une mort cellulaire programmée impliquée dans les processus physiologiques du développement, du vieillissement, et du maintien de l'homéostasie tissulaire. Ce processus permet de contrôler le nombre de cellules générées et d'éliminer de manière physiologique les cellules endommagées ; tout dysfonctionnement de ce mécanisme peut être délétère. Une altération de ce mécanisme a été rapportée dans la pathogenèse de maladies neurodégénératives, telles que la SLA (pour revue, voir (Sathasivam et al., 2001)).

Les principaux acteurs moléculaires contribuant au contrôle de l'apoptose comprennent : la famille d'oncoprotéines Bcl-2, constituées de protéines pro- et anti-apoptotiques impliquées dans la régulation de la survie ou la destruction des cellules; la famille des caspases, des enzymes protéolytiques qui interviennent lors de la phase d'exécution de l'apoptose; et la famille d'inhibiteurs de l'apoptose qui empêchent l'activation de caspases spécifiques. Deux voies principales déclenchant l'activation des caspases ont été identifiées : 1) la voie mitochondriale impliquant la libération d'un facteur pro-apoptotique des mitochondries, le cytochrome c, 2) la voie extracellulaire impliquant l'activation de récepteurs de surface cellulaire spécifique par des ligands inducteurs de mort cellulaire (tel que Fas) (Sathasivam et al., 2001; Shaw, 2005). Des protéines pro-apoptotiques (Bad, Bax) et des protéines anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-XL) mitochondriales régulent la libération de cytochrome c. Une perturbation de l'équilibre entre ces deux classes protéiques provoque la libération du cytochrome c dans le cytoplasme conduisant à l'activation de la caspase 9, qui elle-même active les caspases 1 et 3 (Shaw, 2005).

Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, la libération cytosolique du cytochrome c a été observée (Kirkinezos et al., 2005; Tan et al., 2014), et les niveaux de protéines pro-apoptotiques Bad et Bax sont augmentés alors que ceux des protéines anti-apoptotiques Bcl2, Bcl-xL et XIAP sont diminués dans la moelle épinière (Guégan et al., 2001; Ishigaki et al., 2002). D'autre part, il a été également observé une activation des caspases 1 et 3 dans les MnS et les astrocytes des souris *SOD1<sup>G37R</sup>* et *SOD1<sup>G85R</sup>* (Li et al., 2000; Pasinelli et al., 1998, 2000). Enfin, l'administration de minocycline, impliquée dans l'inhibition de la libération de cytochrome c, retarde l'apparition de la maladie et augmente la survie des souris transgéniques (Van Den Bosch et al., 2002; Zhu et al., 2002).

Ainsi, les études menées notamment sur des tissus post-mortem de patients SLA et les modèles murins *SOD1* ont permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie la maladie. Ceci a permis le développement de nombreuses

stratégies thérapeutiques qui ont fait l'objet d'études précliniques puis cliniques. Cependant, hormis le Riluzole et l'Edaravone, aucune stratégie ne s'est avérée efficace chez l'homme et la compréhension de la pathologie humaine reste de ce fait encore limitée (Eisen, 2009; Perrin, 2014).

Cependant, il est important de noter que la grande majorité de ces études s'est concentrée sur la moelle épinière et les MnBS. Les mécanismes liés au dysfonctionnement et à la mort des NMCS restent quant à eux méconnus. Il est alors possible d'envisager que : 1) la dégénérescence des NMCS ait un rôle prépondérant dans l'atteinte des MnBS, 2) que la dégénérescence des NMCS réponde à des mécanismes moléculaires qui leurs sont propres et qui n'ont pas encore été identifiés.

Ces dernières années, le développement de nouvelles techniques de marquage et d'isolement des NMCS, parallèlement au développement de techniques de séquençage adaptées aux petits échantillons cellulaires, permettent à présent d'envisager l'identification des voies de signalisation à l'origine du dysfonctionnement et de la dégénérescence des NMCS dans la SLA. Dans ce contexte, un des objectifs de ce travail de thèse a été d'initier l'identification des mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette dégénérescence, dans le but, à plus long terme, de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Pour cela, nous avons tiré profit d'un modèle murin SOD1, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, qui récapitulent les symptômes observés chez les patients SLA (voir partie III.3) mais dont la dégénérescence des NMCS était restée jusqu'à ces travaux de thèse non révélée.

Chapitre IV.

**Place du cortex cérébral  
et des Neurones Moteurs Cortico-Spinaux dans  
la recherche sur la SLA**

Si le cortex cérébral et les NMCS ont été longtemps négligés par les recherches précliniques, de récents travaux dans les domaines de la génétique, de l'imagerie et de l'histopathologie des patients SLA suggèrent un rôle potentiel majeur du cortex cérébral non seulement dans la pathophysiologie de la maladie, mais également dans son étiologie. Elles soulignent la nécessité d'intégrer à présent l'étude du cortex cérébral et des NMCS dans les recherches précliniques menées sur la maladie.

## 1. Altérations du cortex cérébral et des NMCS chez les patients SLA

### 1.1 Données d'imagerie médicale

Les nombreuses analyses d'imagerie médicale du SNC menées chez les patients SLA ont montré des anomalies fonctionnelles et structurales du cortex cérébral (pour revue, voir (Chio et al., 2014)).

#### 1.1.1 Anomalies fonctionnelles

Le fonctionnement cortical peut être facilement évalué *in vivo* en utilisant la SMT. Cet outil clinique non invasif permet d'évaluer le fonctionnement des neurones à projection sous-cérébrale, tels que les cellules de Betz ou NMCS, mais également des réseaux neuronaux intracorticaux dans le M1. Au cours de la dernière décennie, les études fonctionnelles basées sur cette technique ont fourni des informations importantes sur la pathogenèse de la SLA, en particulier, sur le rôle du dysfonctionnement cortical (pour revue, voir (Vucic et al., 2013)).

La SMT a permis d'identifier une diminution de l'inhibition intracorticale par les interneurons inhibiteurs, rendant les neurones moteurs corticaux hyperexcitables dans les cas sporadiques et familiaux de patients SLA (Shibuya et al., 2017; Vucic et al., 2008; Vucic & Kiernan, 2006) (Figure 16). De plus, selon une récente étude menée par Shibuya et ses collègues, cette diminution s'accroîtrait avec la progression de la maladie (Shibuya et al., 2017). De façon intéressante, il apparaît que ce dysfonctionnement cortical est un phénomène précoce dans la SLA, qui précède le début du dysfonctionnement des motoneurons spinaux (Menon, Kiernan, et al., 2015; Vucic & Kiernan, 2006). Aujourd'hui, ce dysfonctionnement cortical est reconnu comme une caractéristique précoce et importante dans les cas familiaux de la SLA, incluant les phénotypes liés aux mutations dans les gènes *SOD1* (Vucic et al., 2008), *FUS* (Blair et al., 2010) et *C9ORF72* (Geevasinga, Menon, Nicholson, et al., 2015).

Ainsi, ces études fonctionnelles soulignent l'importance du dysfonctionnement des populations d'interneurones corticaux dans la pathogenèse de la SLA, idée soutenue par des études réalisées sur des modèles murins (discutées dans la partie IV. 2.).

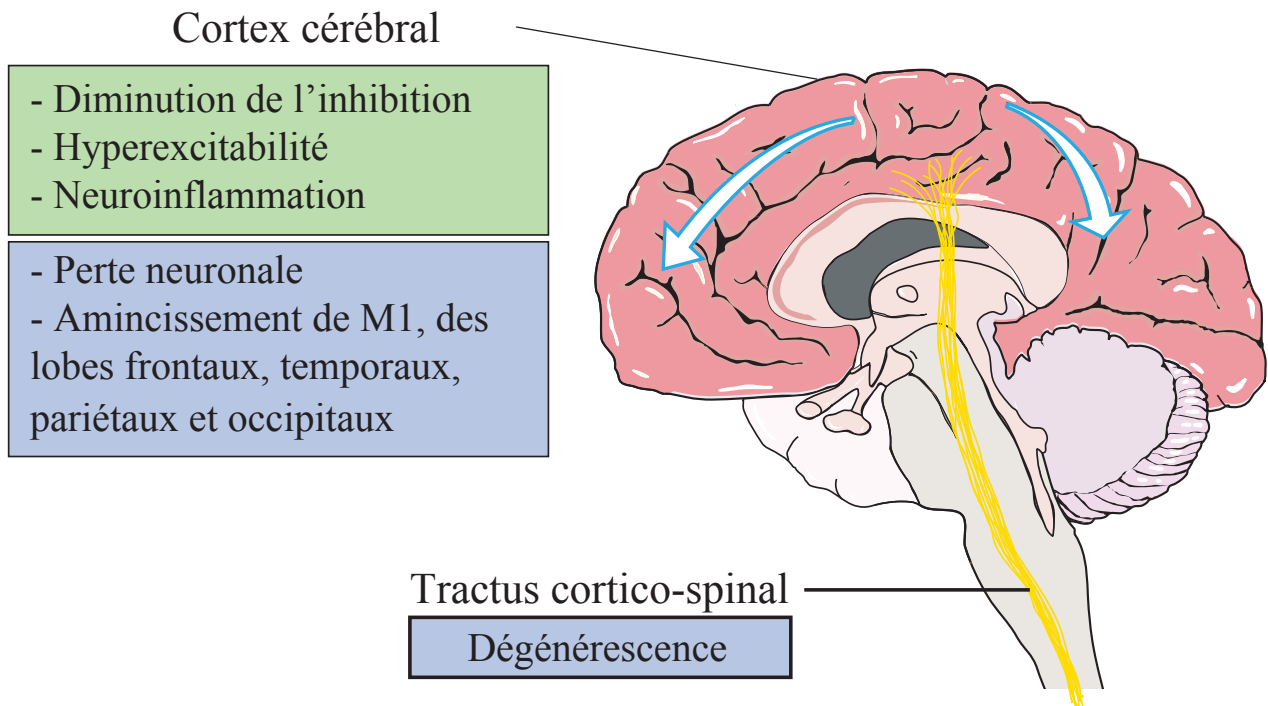


Figure 16. **Atteintes du cortex cérébral chez les patients SLA**

Principales atteintes structurales (cadres bleus) et fonctionnelles (cadres verts) détectées par analyses d'imagerie médicale chez les patients SLA (adaptée de (Chio et al., 2014)).

### 1.1.2 Anomalies structurales

Les techniques de neuro-imagerie ont également révélé des anomalies importantes au niveau de la structure corticale chez les patients SLA. Un amincissement cortical au niveau du M1 et du lobe temporal a été observé par IRM quantitative chez les patients (Verstraete et al., 2012). De plus, il apparaît que l'amincissement cortical au niveau du lobe temporal est corrélé à une progression plus agressive de la maladie (Verstraete et al., 2012). Ainsi, ces atteintes corticales ne se limitent pas au cortex moteur et sont présentes également au niveau du lobe frontal, du lobe pariétal et du corps calleux. Elles sont associées à la gravité de la maladie, à sa progression, et sont à l'origine d'atteintes cognitives. Ces atteintes sont observées dans les différents phénotypes de SLA (Chio et al., 2014; Turner et al., 2012) (Figure 16). L'atteinte du M1 s'accompagne également d'une dégénérescence du TCS mise en évidence par imagerie par tenseur de diffusion (ITD), au niveau du cerveau et de la moelle épinière (Chio et al., 2014; Turner et al., 2012).

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et la tomographie par émission de positrons (TEP) ont par ailleurs révélé que l'amincissement cortical s'accompagne d'une perte neuronale. Celle-ci a été mise en évidence par une baisse des concentrations de N-acétylaspartate ainsi que d'une diminution du nombre de récepteurs GABA-A (acide  $\gamma$ -aminobutyrique-A) et Sérotonine-1A sur les neurones excitateurs et inhibiteurs (TEP) (Chio et al., 2014; Eisen & Weber, 2001; Turner et al., 2012). La TEP a également permis de détecter une neuroinflammation cérébrale étendue chez des patients SLA (Turner et al., 2004).

Les études de connectivité structurale par ITD ont révélé une atteinte des réseaux neuronaux dans la région cérébrale aux alentours des régions motrices primaire et secondaire chez les patients SLA (Verstraete et al., 2011). Les zones affectées semblent s'étendre au cours du temps, vers les régions de projection de ces neurones telles que les lobes frontaux et pariétaux, suggérant un mode de propagation de la SLA basé sur la connectivité structurale (Verstraete et al., 2014). Cette hypothèse est soutenue par l'étude menée par Kassubek et ses collègues (2014) sur les tractus impliqués dans la maladie montrant une atteinte séquentielle de différents tractus (Kassubek et al., 2014). Des études récentes de modélisation renforcent cette hypothèse, en montrant que la propagation de la maladie est déterminée par la topologie des réseaux neuronaux corticaux et sous-corticaux (discutées plus en détail dans la partie IV.4) (Schmidt et al., 2016).

Dans l'ensemble, ces données d'imagerie soutiennent une atteinte première du cortex, d'un point de vue fonctionnel (désinhibition et hyperexcitabilité corticale) et structural (amincissement cortical, perte neuronale). En outre, elles suggèrent une propagation corticofuge de la pathologie, le long des projections des neurones situés dans les régions premièrement affectées.



## 1.2 Données cliniques

L'observation des signes de l'atteinte des NMCS et des MnBS (détaillée dans la partie III 3.1), a fourni le premier indice selon lequel les mécanismes corticaux sont importants dans la pathogenèse de la SLA. En effet, rappelons que les signes de l'atteinte des NMCS, chez les patients SLA, se traduisent par des mouvements lents, un signe de Babinski, une spasticité et une hyperréflexie. Néanmoins, avant de développer des signes cliniques prononcés et caractéristiques de la maladie, les patients atteints de SLA sont souvent conscients d'une variété de petites atteintes. Ces atteintes sont principalement contrôlées par des aires corticales impliquées dans la motricité avec notamment le M1, le M2 et les TCS et TCB. Ces atteintes incluent par exemple une altération de la marche caractérisée par une démarche maladroite et hésitante. Il est également observé une altération du contrôle fin de la main et des mouvements oro-faciaux, tels que ceux effectués lors de la manipulation de l'objet et de la phono-articulation (pour revue voir (Eisen, 2009; Eisen et al., 2014)).

## 1.3 Données histopathologiques

Les analyses post-mortem de cerveaux de patients SLA indiquent une perte importante des NMCS de la couche V (Hammer et al., 1979; Mochizuki et al., 1995; Nihei et al., 1993; Sasaki & Iwata, 2000). Les NMCS restants présentent quant à eux une atrophie du corps cellulaire, une dégénérescence des dendrites apicales et une diminution des épines dendritiques (Nihei et al., 1993) (Figure 17). Une augmentation du pigment lipofuscine dans les NMCS de patients SLA a été observée. Ce pigment, impossible à dégrader ou à éliminer par exocytose, composé de débris de molécules, apparaît dans les cellules au cours du vieillissement normal et perturbe le fonctionnement cellulaire. Sa présence au sein des NMCS résiduels des cerveaux de patients SLA témoigne donc de l'altération sélective du bon fonctionnement de ces cellules (Hammer et al., 1979).

De plus, comme l'a indiqué le chapitre 3, la majorité des patients SLA présentent des agrégats intra-cytoplasmiques de TDP-43 phosphorylée (Brettschneider et al., 2013), hormis les patients porteurs de mutation *SOD1* ou *FUS* (Farrarwell et al., 2015; Rademakers et al., 2010). Enfin, des foci intra-nucléaires d'ARN, des agrégats de dipeptides et de P62 sont également présents dans le cerveau de patients SLA présentant des expansions répétées de *C9ORF72* (Ash et al., 2013; Mori et al., 2013). Ainsi, sachant que la formation d'agrégats intra-cytoplasmiques peut être associée à un dysfonctionnement et une dégénérescence neuronale, l'identification de telles inclusions dans le cortex cérébral est le signe d'une atteinte corticale.

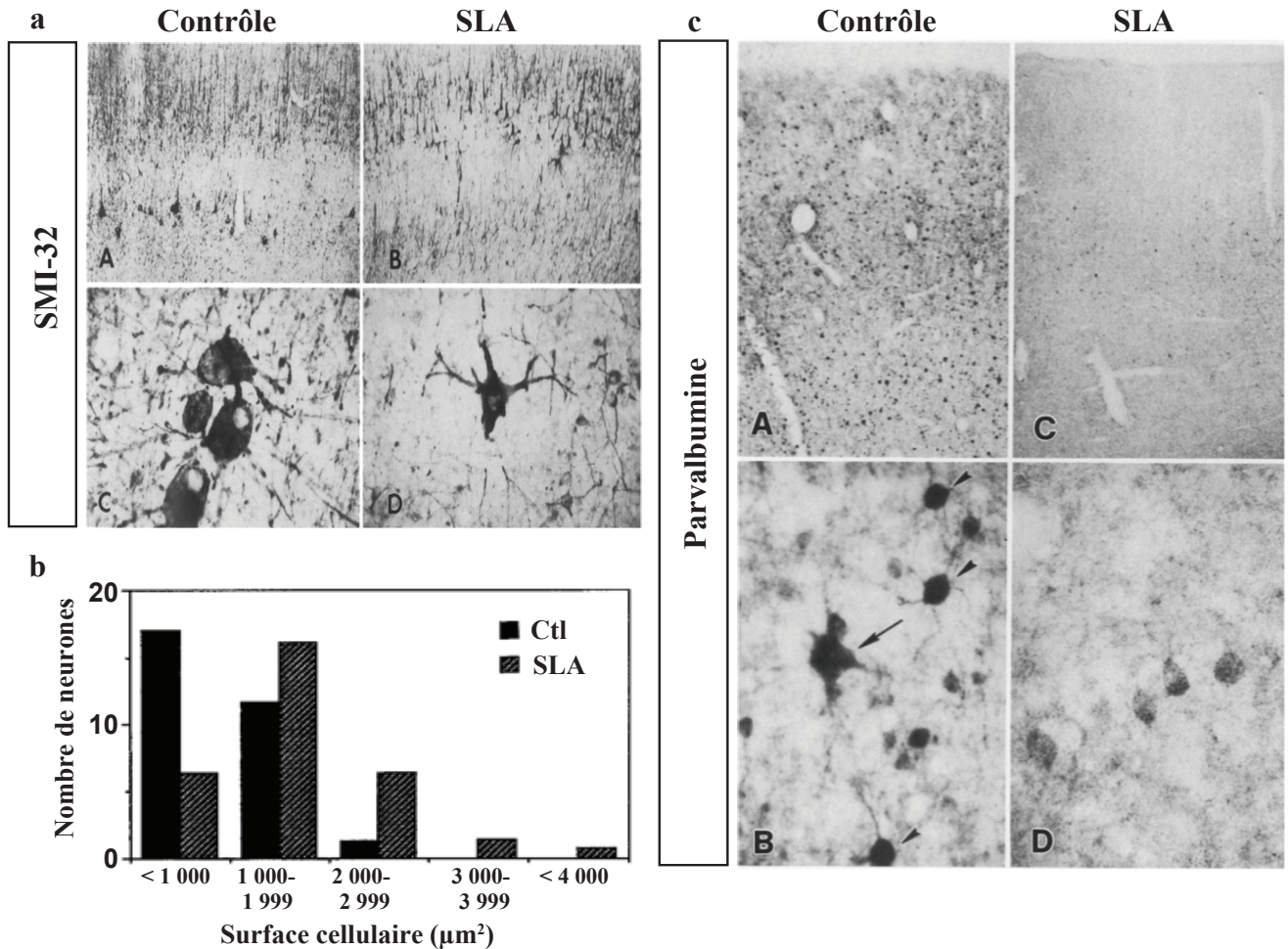


Figure 17. Atteintes histopathologiques du cortex et des NMCS chez les patients SLA

**a-b.** Les analyses histopathologiques des cerveaux de patients SLA révèlent une perte des cellules de Betz comparée aux contrôles. Cette perte est révélée par marquage immunohistochimique de SMI-32 (marqueur des neurofilaments). Les cellules de Betz résiduelles présentent des somas plus petits chez les patients SLA que chez les contrôles (**a.D** et **b**). **c.** Une perte des interneurons positifs pour la Parvalbumine est également observée, chez les patients SLA, comparés aux contrôles (tirée de (Nihei et al., 1993)).

Ces dommages ne sont pas limités à la couche V du cortex où résident les NMCS. Sasaki et Iwata (1999) ont détecté une altération de terminaisons présynaptiques axosomatiques sur les NMCS, caractérisée par une augmentation du nombre de mitochondries et la présence d'agrégats formés de mitochondries et de vésicules présynaptiques. Ces altérations sont le signe d'une atteinte de la connectivité et de ce fait d'une atteinte de la réception d'informations par les NMCS (Sasaki & Iwata, 1999). On observe également un rétrécissement cellulaire d'autres types neuronaux, particulièrement dans la couche III, la perte d'interneurones exprimant la Parvalbumine (Figure 17) et une gliose sous-corticale (Nihei et al., 1993). Des amas d'astrocytes réactifs ont été observés non seulement dans le cortex moteur, mais également dans les régions corticales non motrices et sous-corticales chez les patients SLAs et SLAf (Nagy et al., 1994).

Ainsi, les études post-mortem de patients SLA montrent des preuves histologiques d'une atteinte du cortex et des NMCS chez ces patients. En outre, prises dans leur ensemble, ces études récentes d'imagerie structurale et fonctionnelle soulignent un dysfonctionnement cortical précoce et apportent des éléments en faveur de l'hypothèse d'une origine corticale de la SLA (développées dans la partie IV. 4).

## 2. Altérations du cortex cérébral et des NMCS dans les modèles murins de SLA

### 2.1 Dégénérescence progressive des NMCS

Les premières études précliniques des NMCS dans la SLA ont été menées chez les souris transgéniques *SOD1*. Le marquage rétrograde depuis le funicule dorsal de la moelle épinière (lieu de passage des axones des NMCS) a permis de mettre en évidence une perte progressive de NMCS chez les souris *SOD1<sup>G93A/G1H</sup>* (Zang & Cheema, 2002) et les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Ozdinler et al., 2011), ainsi qu'une perte de leurs axones (Ozdinler et al., 2011; Zang & Cheema, 2002) (Figure 18A et B). Cette perte neuronale serait associée à des mécanismes apoptotiques (Ozdinler et al., 2011). Ces résultats ont été récemment confirmés par injection virale d'AAV-eGFP (virus adénoassociés permettant l'expression d'une protéine fluorescente verte) dans le funicule dorsal de la moelle épinière, de manière à marquer non seulement les corps cellulaires, mais également les prolongements dendritiques (Yasvoina et al., 2013). Enfin, des résultats similaires ont été obtenus par croisement des souris *SOD1<sup>G93A</sup>* aux souris *UCHL1-eGFP* qui expriment le gène eGFP sous le contrôle du promoteur du gène ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1 (*UCHL1*), et permettent de visualiser les neurones pyramidaux de la couche V du cortex cérébral (Yasvoina et al., 2013).

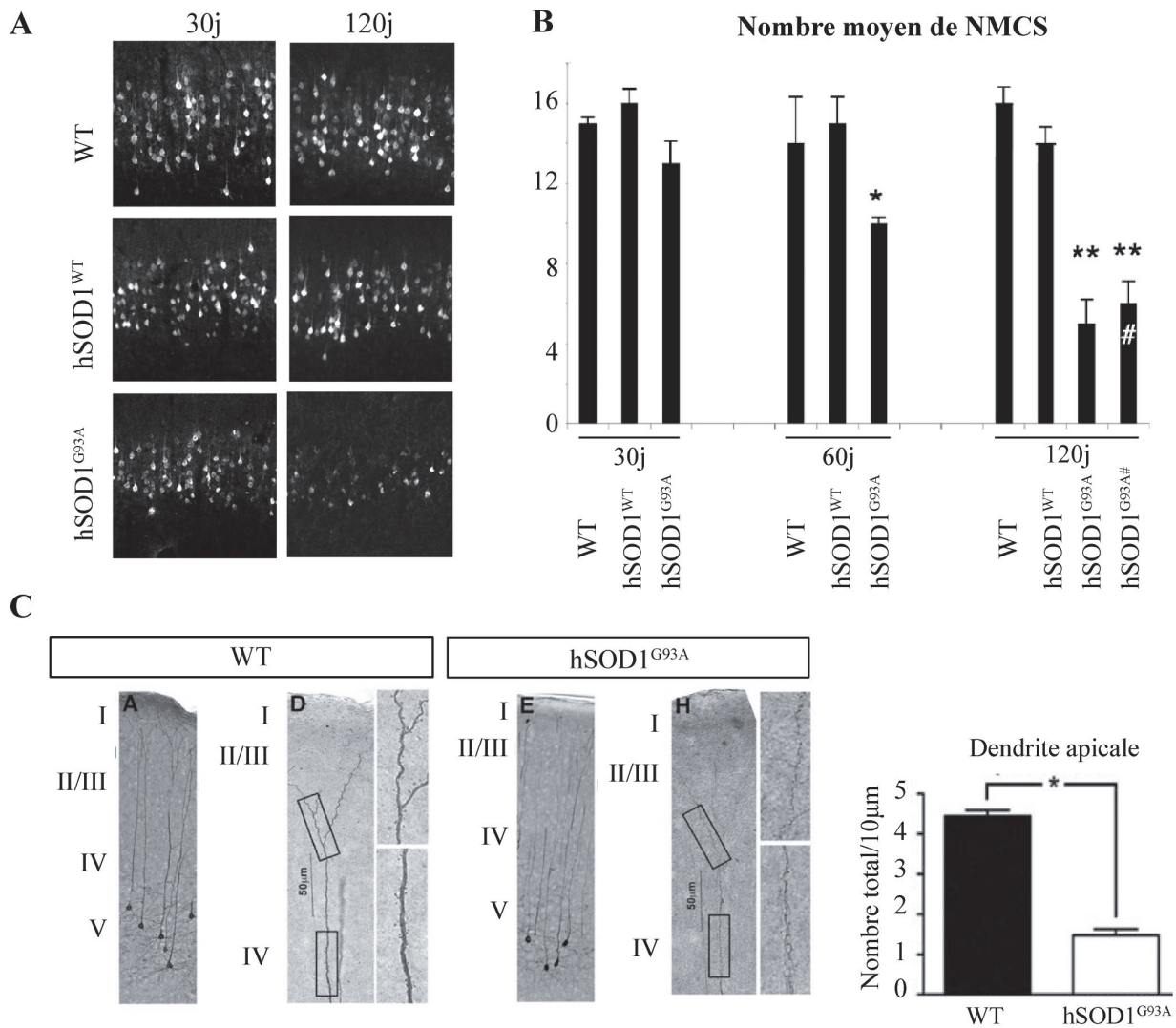


Figure 18. Atteinte du cortex et des NMCS dans un modèle murin SOD1 de SLA

**A.** Une diminution du nombre de NMCS a été mise en évidence par marquage rétrograde des NMCS par injection de Fluorogold dans le funicule dorsal de la moelle épinière cervicale chez les souris *Sod1*<sup>G93A</sup> par rapport aux contrôles. **B.** La perte des NMCS a lieu dès 60 jours, un stade présymptomatique de la maladie. **C.** Cette perte s'accompagne d'une dégénérescence de leur dendrite apicale (tirée de (Jara et al., 2012; Ozdinler et al., 2011)).

Outre cette perte progressive de la population de NMCS dans ces modèles murins de SLA, les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* présentent également une dégénérescence des dendrites apicales des NMCS caractérisée par une diminution du nombre d'épines dendritiques et la présence de vacuoles. Cette dégénérescence affecte essentiellement les dendrites présentes au niveau des couches II et III, et serait associée à une augmentation de l'autophagie (Fogarty et al., 2015, 2016; Jara et al., 2012; Yasvoina et al., 2013) (figure 18C). Les dendrites basales des NMCS semblent elles aussi affectées chez ces souris, avec une élongation et une plus grande ramification en présymptomatique (Jara et al., 2012; Saba et al., 2015), suivie d'un rétrécissement et d'une diminution de la densité des épines en symptomatique (Fogarty et al., 2016). L'altération des dendrites et épines dendritiques des NMCS, et notamment celles des dendrites apicales qui sont spécialisées dans le recueil d'informations excitatrices depuis le thalamus et le cortex cérébral controlatéral, pourrait être une des causes de l'hyperexcitabilité qui caractérise les NMCS des souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (voir IV.4.2.2. Hyperexcitabilité des NMCS dans les modèles *SOD*).

D'autres modèles murins de la SLA, plus récents, n'ont pas encore fait l'objet d'une caractérisation aussi détaillée de la dégénérescence des NMCS. Cependant les souris *TDP-43<sup>A315T</sup>* surexprimant un mutant du gène humain *TARDBP*, sous contrôle du promoteur du Prion, développent des symptômes moteurs similaires à ceux de la SLA (Herdewyn et al., 2014; Wegorzewska et al., 2009). Bien que ce modèle soit critiqué, car ces souris décèdent de problèmes gastro-intestinaux avant le développement complet des symptômes moteurs (Esmaeili et al., 2013), elles présentent néanmoins une accumulation cytoplasmique d'agrégats ubiquitinylés dans les neurones de la couche V du cortex cérébral, une altération des dendrites apicales, une astroglie et microglie restreintes à cette même couche, ainsi qu'une dégénérescence du TCS (Herdewyn et al., 2014; Wegorzewska et al., 2009; Zhang et al., 2016). De plus, des modèles murins d'expansions d'hexanucléotides G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> du gène *C9ORF72* ont également été récemment générés (Chew et al., 2015; Liu et al., 2016). L'injection, au sein du SNC, d'AAV permettant l'expression du gène *C9ORF72* et de 66 expansions de G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> a permis la mise en évidence, parmi d'autres caractéristiques, d'une perte de neurones corticaux, notamment dans la couche V de l'aire motrice (Chew et al., 2015). De même, la génération d'un modèle transgénique BAC surexprimant un mutant de *C9ORF72* a permis la mise en évidence de symptômes similaires à la SLA et la DFT, accompagnés, entre autres, d'une perte de neurones dans la couche V du cortex moteur et d'une astroglie corticale (Liu et al., 2016).

Enfin, si plusieurs modèles murins de mutation du gène *FUS* ont été développés, aucun à l'heure actuelle n'a testé ou rapporté l'altération de NMCS, ce qui ne signifie pas pour autant qu'elle n'existe pas.

Ainsi, dans la plupart des modèles murins générés récemment, la dégénérescence des

NMCS n'a pas été directement testée (par des marquages rétrogrades ou immunologiques avec des anticorps spécifiques de la couche V du cortex cérébral, et un comptage rigoureux) comme cela a été fait dans les modèles *SODI<sup>G93A</sup>* et *SODI<sup>G93A/G1H</sup>*. Cependant, l'altération (ubiquitinylation et gliose) et la diminution de la densité des neurones de la couche corticale V suggèrent que les modèles *TDP-43* et *C9ORF72* récapitulent également une dégénérescence des NMCS.

Dans l'ensemble, ces études précliniques, bien que peu nombreuses, montrent une atteinte des NMCS telle que celle observée chez les patients SLA. Elles n'ont cependant pas encore permis d'identifier des mécanismes moléculaires qui pourraient être responsables de leur dégénérescence.

## 2.2 Hyperexcitabilité des NMCS

Chez les souris *SODI<sup>G93A</sup>*, une hyperexcitabilité (Fogarty et al., 2015; Saba et al., 2015) et une augmentation de l'expression du transporteur vésiculaire du glutamate 2 (VGLUT2) (Saba et al., 2015) par les neurones de la couche V du cortex cérébral ont été rapportées. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Pieri et collaborateurs qui a montré que les neurones corticaux provenant de souris *SODI<sup>G93A</sup>*, en culture primaire, présentent des propriétés intrinsèques d'hyperexcitabilité (Pieri et al., 2009). De même, les souris *TDP-43<sup>A315T</sup>* présentent une hyperexcitabilité des neurones excitateurs de la couche V du M1 (Zhang et al., 2016).

Bien que le rôle de l'hyperexcitabilité dans la SLA fasse l'objet de discussions, ces dernières données favorisent l'hypothèse d'une étiologie excitotoxique de la SLA (Foran & Trotti, 2009; le Verche et al., 2011) : l'hyperexcitabilité des NMCS pourrait induire une augmentation du relargage du glutamate dans le tronc cérébral et la moelle épinière, et ainsi contribuer à l'excitotoxicité qui affecte les MnBS.

## 2.3 Atteinte des interneurones inhibiteurs corticaux

L'hyperexcitabilité des NMCS pourrait résulter d'une augmentation des afférences excitatrices (quantitative ou qualitative), d'une diminution des afférences inhibitrices (quantitative ou qualitative), ou d'altérations intrinsèques de l'excitabilité neuronale. Les modèles murins *SODI<sup>G93A</sup>* et *TDP-43<sup>A315T</sup>* ont récemment fourni de premiers éléments de réponse. En effet, les souris *SODI<sup>G93A</sup>* présentent une diminution du nombre d'interneurones inhibiteurs exprimant la calrétinine (CR) dans les couches supérieures II/III durant la phase symptomatique (Clark et al., 2017). De plus, une diminution initiale de la densité d'interneurones inhibiteurs exprimant le neuropeptide Y est observée lors de l'apparition des symptômes, suivie d'une augmentation au stade final de la maladie chez ces mêmes animaux (Clark et al., 2017). Ces résultats indiquent une altération probable de la balance excitation/inhibition corticale, et suggèrent qu'une altération des populations d'interneurones inhibiteurs pourrait contribuer à une modification de l'activité

électrophysiologique des NMCS.

Par ailleurs, l'hypothèse d'une origine corticale de l'excitotoxicité dans la SLA est soutenue par une étude récente menée chez les souris transgéniques *TDP-43<sup>A315T</sup>* (Zhang et al., 2016). Ces animaux présentent une hyperactivité des neurones de la couche V du cortex moteur (M1) accompagnée d'une diminution de la densité des synapses GABAergiques sur les corps cellulaires de ces neurones (Zhang et al., 2016). De plus, une altération de l'activité de deux populations d'interneurones inhibiteurs est observée : une hyperactivation des interneurones exprimant la SST et une hypoactivation des interneurones exprimant la PV. Les auteurs proposent un mécanisme selon lequel les interneurones SST hyperactifs seraient à l'origine de l'hyperexcitabilité des neurones excitateurs de la couche V, en inhibant les interneurones PV, qui en retour n'assureraient plus une inhibition suffisante des neurones excitateurs de la couche V (Zhang et al., 2016). Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont éliminé les interneurones SST et mis en évidence une restauration de l'activité physiologique des neurones excitateurs de la couche V, une réduction de la charge d'agrégats positifs pour l'ubiquitine et un maintien de cette population cellulaire (Zhang et al., 2016).

Dans leur ensemble, ces données récentes soulignent un rôle important des interneurones inhibiteurs corticaux non seulement dans l'excitabilité des NMCS (en accord avec les observations chez les patients (4.1)), mais également dans la pathophysiologie de la SLA.

### **3. Initiation et propagation de la dégénérescence dans la SLA : le débat**

La question de savoir où la SLA débute et de quelle manière elle se propage reste encore aujourd'hui sujette à débat. Le neurologue Jean-Martin Charcot proposait une dégénérescence initiale des NMCS dans SLA, suivie d'une dégénérescence des MnBS (Charcot & Joffroy, 1869), selon un mode de propagation antérograde, aussi appelé descendant. Une atteinte indépendante des deux populations neuronales fut ensuite proposée (Kiernan & Hudson, 1991; Pamphlett et al., 1995), ainsi que l'hypothèse d'une propagation rétrograde ou ascendante (Gowers, 1888) qui semble avoir conquis le terrain des recherches précliniques (Figure 19).

#### **3.1 Atteintes indépendantes des NMCS et des MnBS**

L'hypothèse d'atteintes indépendantes des NMCS et des MnBS est essentiellement basée sur des études neuropathologiques comparant les densités de NMCS et de MnBS dans les régions corticales et spinales d'innervation des muscles de la main. Ces études ont montré une absence de corrélation entre les atteintes corticales (NMCS) et spinales (MnBS) (Kiernan & Hudson, 1991; Pamphlett et al., 1995).

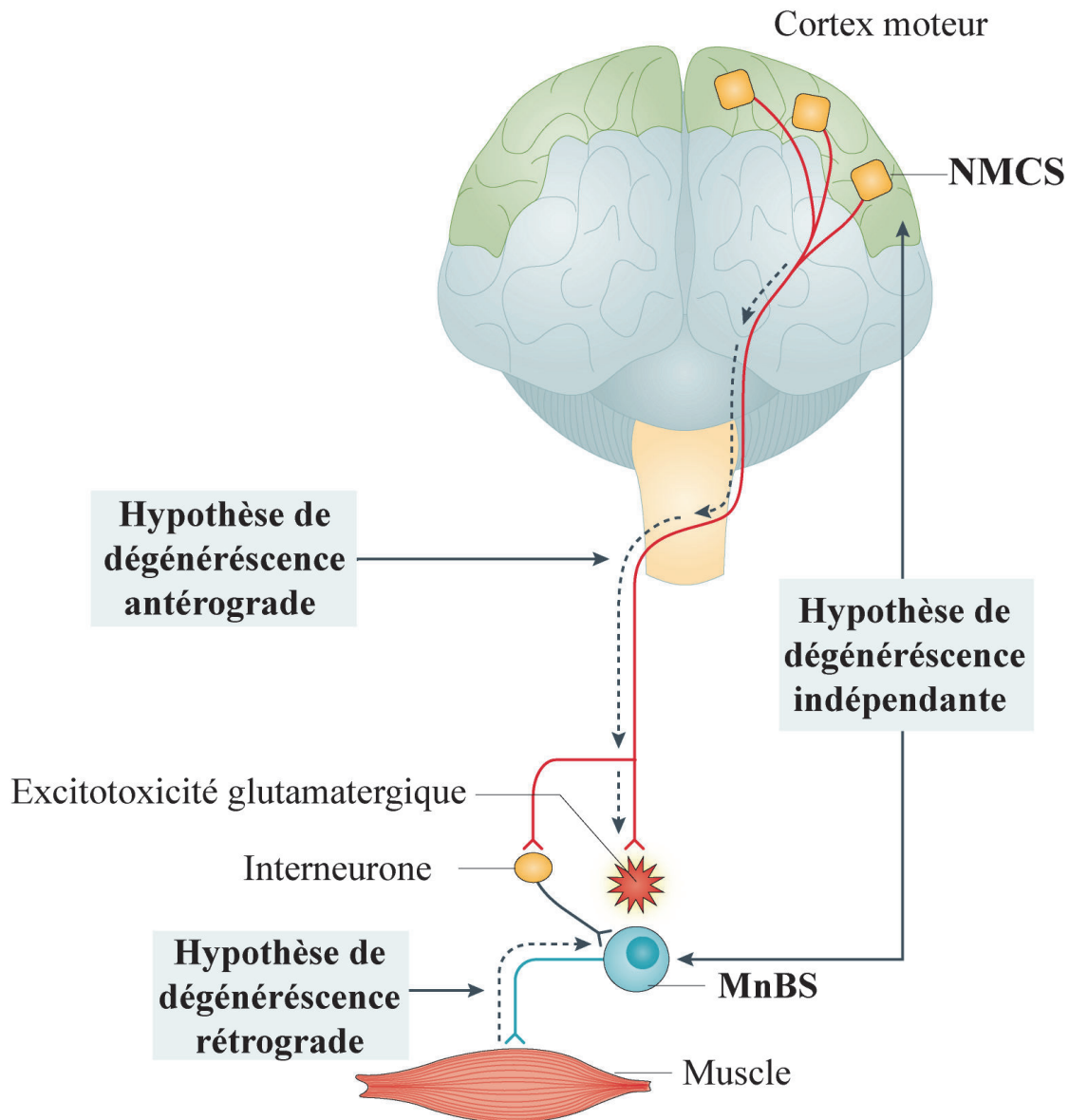


Figure 19. **Hypothèses du site d'apparition et de la progression de la SLA**

Trois hypothèses d'initiation et de propagation de la dégénérescence dans la SLA ont été proposées. Une hypothèse antérograde proposée par Jean-Martin Charcot, débutant dans le cortex cérébral avec une dégénérescence initiale des NMCS qui se propage vers les MnBS. Une hypothèse de propagation rétrograde débutant des extrémités axonales des MnBS et se propageant vers le corps cellulaire. Enfin, une hypothèse d'une atteinte indépendante des deux populations neuronales (adaptée de (Geevasinga et al., 2016)).



Néanmoins, ces méthodes de corrélation post-mortem ont été critiquées (Eisen & Weber, 2001). De plus, les observations cliniques montrent que l'extension des symptômes ne se produit pas au hasard. En effet, les symptômes, tels que la faiblesse et l'atrophie s'aggravent progressivement au début de leur apparition et se propagent généralement vers des régions contiguës, d'une région à l'autre, ou d'un côté du corps vers le côté controlatéral (Pradat et al., 2015; Ravits, 2014; Ravits et al., 2007; Ravits & La Spada, 2009). Cette propagation contiguë est désormais avérée et reconnue ; et l'hypothèse d'atteintes indépendantes des populations de NMCS et de MnBS est désormais désuète.

### **3.2 Propagation rétrograde, ascendante ou « *dying-back* »**

L'hypothèse d'une propagation rétrograde de la SLA, propose, quant à elle, que la maladie commencerait dans les cellules musculaires, ou au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM), se répandant ensuite des MnS vers les NMCS du cortex (Chou & Norris, 1993). Cette hypothèse repose sur l'observation d'une dégénérescence wallérienne des axones des MnBS, c'est-à-dire depuis l'extrémité de l'axone vers le corps cellulaire (Dal Canto & Gurney, 1994; Fischer et al., 2004).

Différents mécanismes conduisant à la perte progressive des MnBS dans la SLA ont été suggérés par cette hypothèse. L'une des théories est qu'une accumulation de complexes insolubles pourrait être responsable de l'altération de la terminaison axonale. Cette altération axonale, pouvant se traduire par une perturbation de l'activité de la dynéine par exemple, pourrait inhiber le transport rétrograde vers le corps cellulaire des MnBS, de facteurs neurotrophiques libérés par les cellules post-synaptiques des muscles striés squelettiques. Ces altérations confèreraient ainsi des dommages sélectifs aux MnBS.

Un autre mécanisme qui a été proposé est une expression ou une activité aberrante de protéines impliquées dans le guidage axonal, contribuant aux changements pathologiques précoces de connexions des MnBS avec les muscles. L'expression anormale de protéines de guidage axonal influencerait le transport axonal et la fonction synaptique et conduirait finalement à une perte des MnBS (pour revue, voir (Dadon-Nachum et al., 2011)).

Les principaux arguments en faveur de cette hypothèse de propagation rétrograde résultent d'une part de l'observation que l'atteinte de la JNM précède la dégénérescence des MnS (Fischer et al., 2004), et d'autre part que l'accumulation de la protéine SOD1 mutée dans les cellules de Schwann peut servir de base à la dénervation synaptique (Arbour et al., 2015).

Cependant, la dégénérescence wallérienne des MnBS ne permet pas d'affirmer que ces neurones dégénèrent les premiers et induisent dans un second temps la dégénérescence des NMCS. En outre, d'autres arguments allant à l'encontre de cette hypothèse existent. En effet, selon Pun et

ses collaborateurs, la dénervation serait le reflet d'une vulnérabilité sélective des propriétés de l'axone des motoneurones et non du muscle cible ou de la JNM (Pun et al., 2006), remettant en question une atteinte première des muscles ou des JNM. D'autre part, l'observation chez les patients SLA d'un dysfonctionnement de régions corticales non motrices, responsables de déficits cognitifs, semble difficile à concilier avec une dégénérescence rétrograde (Turner et al., 2009; Vucic et al., 2013). Enfin, l'absence d'une atteinte du cortex cérébral dans les maladies affectant uniquement les MnS, telles que la maladie de Kennedy, constitue un autre argument contre cette hypothèse (Eisen & Weber, 2001; Hirota et al., 2000).

### 3.3 Propagation antérograde, descendante ou « *dying-forward* »

L'hypothèse de propagation antérograde initialement proposée par le Dr Charcot (Charcot & Joffroy, 1869) a été réévaluée par Eisen et ses collègues en 1992 (Eisen et al., 1992), suggérant une atteinte première des NMCS qui entraîne une dégénérescence des MnBS de la corne antérieure de la moelle épinière par un mécanisme d'excitotoxicité glutamatergique antérograde. Récemment, cette hypothèse connaît un renouveau à la faveur de données grandissantes et complémentaires. Les arguments, passés et récents, en faveur d'une origine corticale de la maladie sont détaillés et discutés dans la partie suivante.

## 4. Arguments en faveur d'une origine corticale de la maladie

L'origine de la SLA fait encore débat. Néanmoins, de récents travaux menés dans les domaines de la génétique, de la clinique, de l'imagerie, et des analyses post-mortem des patients SLA, suggèrent un rôle initiateur du cortex cérébral.

### 4.1 Arguments génétiques

Les avancées considérables de la génétique au cours de ces dernières années ont permis la découverte de nouvelles mutations sur les gènes *TARDBP* en 2008, *FUS* en 2009 et *C9ORF72* en 2011, qui représentent à eux trois 50% des cas familiaux de SLA. La découverte de ces gènes a permis de renforcer le lien entre la SLA et une autre maladie neurodégénérative, la démence fronto-temporale (DFT), puisque la mutation de ces gènes est également à l'origine de cas de DFT (Ling et al., 2013) (cf. Figure 3 du chapitre 3). La DFT se caractérise par une perte neuronale et une atrophie du cortex frontal et temporal, sans affecter le TCS et les MnBS de la moelle épinière. Les patients DFT présentent des altérations comportementales (apathie, changement des habitudes alimentaires) et du langage (Ling et al., 2013; van Langenhove et al., 2012).

Au-delà de la génétique, le lien entre SLA et DFT est également pathologique. En effet, la grande majorité des patients atteints de SLA (97%), qu'il s'agisse de cas familiaux ou sporadiques,

et jusqu'à 45% des patients atteints de DFT présentent des inclusions cytoplasmiques phosphorylées de la protéine TDP-43 (Ling et al., 2013; Neumann et al., 2006; van Langenhove et al., 2012).

Ainsi, ces données génétiques et pathologiques indiquent un lien étroit entre SLA et DFT, dont le dénominateur commun est l'atteinte du cortex cérébral, qu'il s'agisse du cortex moteur (SLA) ou du cortex frontal ou temporal (DFT). Par conséquent, ceci laisse supposer une origine corticale de ces deux maladies.

## 4.2 Arguments cliniques

Un pourcentage non négligeable de patients souffrant de SLA ou de DFT partagent des symptômes caractéristiques de l'autre maladie : environ 15% des patients atteints de SLA développent des déficits comportementaux et cognitifs typiques de la DFT, et environ 15% des patients atteints de DFT développent des troubles moteurs typiques de la SLA (Burrell et al., 2011; Ling et al., 2013; Ringholz et al., 2005). Ainsi, ces deux maladies sont actuellement considérées comme les deux extrêmes d'un continuum clinique unique (Lillo & Hodges, 2009; Lomen-Hoerth et al., 2002).

D'autre part, chez les patients SLA, les fonctions des muscles oculaires, innervés par les MnB oculomoteurs et adoucens (Brettschneider et al., 2013; Büttner-Ennever, 2006; Okamoto et al., 1993), et des muscles contrôlant les sphincters, innervés par les MnS du noyau d'Onuf (Carvalho et al., 1995), sont bien préservées ce qui indique une résistance de ces populations spécifiques de MnBS à la dégénérescence dans la maladie. Sachant que ces motoneurons sont dépourvus de connexions monosynaptiques directes avec les NMCS, ces données offrent un argument supplémentaire en faveur d'une étiologie corticale de la SLA (Büttner-Ennever, 2006; Eisen et al., 1992; Kiernan et al., 2011; Vucic et al., 2014).

Par ailleurs, des études indiquent une atteinte prépondérante du groupe musculaire thénar de la main (par rapport au groupe hypothénar) corrélée à une atteinte plus importante des MnS et des NMCS les innervant. Au niveau cortical, la représentation du groupe musculaire thénar étant plus grande que le groupe hypothénar, ces travaux suggèrent que l'atteinte musculaire de la main serait corrélée à la représentation corticale et à la quantité de connexions corticales directes reçues (Menon et al., 2014; Weber et al., 2000). En outre, l'hyperexcitabilité corticale apparaît comme étant à l'origine de ces signes (Menon et al., 2014). D'autre part, une étude a montré que chez les patients présentant un début d'atteinte des membres supérieurs dans la SLA, l'atteinte était plus susceptible de se manifester du côté du membre dominant (Turner et al., 2011). Du fait qu'il existe des différences d'excitabilité corticale entre les hémisphères dominants et non dominants (Reid &

Serrien, 2012), il a été proposé que les changements d'excitabilité corticale observés chez les patients SLA pourraient contribuer à ces cas de SLA (Turner et al., 2011).

Dans l'ensemble, ces données indiquent une relation somatotopique entre les atteintes des NMCS et des MnS dans la SLA, avec atteinte plus importante des muscles ayant une plus grande représentation corticale et fonctionnelle. En considérant que le cortex moteur est organisé en terme de mouvements et non de muscle et qu'un muscle peut être activé par plusieurs NMCS, les mouvements permettant la dextérité de la main seraient grandement dépendant du groupe musculaire thénar, dont la représentation corticale et fonctionnelle est plus importante (Weber et al., 2000).

Enfin, comme mentionnées précédemment, des études d'imageries ont montré l'importance de l'hyperexcitabilité dans le dysfonctionnement cortical et ont apporté des arguments supplémentaires en faveur d'une origine corticale. En effet, il ressort de ces études que les patients atteints de SLA présentent une hyperexcitabilité corticale initiale précédant le début du dysfonctionnement des motoneurones spinaux dans la SLA (Menon, Kiernan, et al., 2015; Vucic & Kiernan, 2006). De plus, les études longitudinales effectuées sur des patients asymptomatiques porteurs de mutations *SOD1* (Vucic et al., 2008), *FUS* (Blair et al., 2010) et *C9ORF72* (Geevasinga, Menon, Nicholson, et al., 2015) ont révélé que l'hyperexcitabilité corticale se développe avant l'apparition des symptômes cliniques de la SLA. De plus, comme indiqué précédemment, l'hyperexcitabilité corticale pourrait être responsable de l'excitotoxicité glutamatergique qui caractérise la maladie (Geevasinga et al., 2016) et de la dégénérescence des MnBS selon un mécanisme transsynaptique antérograde (Eisen et al., 1992). En outre, l'efficacité, bien que modeste, de l'agent anti-glutaminergique Riluzole (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996) soutient l'importance de l'excitotoxicité dans la maladie (voir III.1.6).

Dans leur ensemble, ces études humaines cliniques, neurologiques, histopathologiques et électrophysiologiques confortent l'hypothèse d'une étiologie corticale de la SLA.

### **4.3 Arguments pathologiques**

L'examen approfondi de la pathologie TDP-43 sur des cerveaux post-mortem de patients SLA a montré que, chez les patients les moins atteints par la pathologie, les inclusions étaient essentiellement retrouvées dans le cortex moteur, le tronc cérébral et la moelle épinière (Brettschneider et al., 2013). En se basant sur la densité d'inclusions phosphorylées TDP-43 dans d'autres régions du cerveau, et sur un grand nombre de patients, les auteurs ont proposé l'hypothèse d'une propagation corticofuge de la pathologie, depuis le cortex moteur vers ses sites de projection. Cette propagation se ferait, selon 4 stades : débutant dans le cortex cérébral (stade 1) elle s'étendrait

progressivement aux sites de projection des neurones corticaux excitateurs : le cortex préfrontal, le gyrus post-central, le tronc cérébral (le noyau rouge, la formation réticulée et les noyaux précérébelleux) (stade 2), d'autres aires préfrontales, des aires sensorielles post-centrales, le striatum (stade 3), et enfin l'hippocampe (stade 4) (Braak et al., 2013; Brettschneider et al., 2013) (Figure 20).

De manière intéressante, l'étude des tractus du cerveau de patients SLA (ITD) vient renforcer cette hypothèse corticofuge (Kassubek et al., 2014). En effet, cette étude montre une atteinte primaire du TCS (stade 1), suivie successivement des tractus cortico-rubral et cortico-pontique (stade 2), puis du tractus cortico-striatal (stade 3) et enfin de la portion proximale de la voie perforante (stade 4) (Kassubek et al., 2014). De plus, une étude récente de connectome par IRM a confirmé elle aussi ces étapes de progression de la neuropathologie, et a montré que la propagation de la maladie est dépendante de la topologie des réseaux cérébraux (Schmidt et al., 2016).

Enfin, il a été récemment observé que la perte de la protéine TDP-43 nucléaire n'entraîne pas la formation de grands agrégats intra-cytoplasmiques de TDP-43 phosphorylées dans les cellules de Betz, contrairement à ce qui est observé dans les MnBS. Les auteurs ont formulé l'hypothèse d'une propagation corticofuge des protéines TDP-43 solubles et toxiques, des cellules de Betz premièrement affectées vers les MnBS avec lesquels elles établissent des connexions directes, conduisant à une dérégulation de TDP-43 dans ces motoneurones (Braak et al., 2017).

L'ensemble de ces données pathologiques soutiennent, elles aussi, l'hypothèse d'une altération primaire du cortex moteur dans la SLA, et d'un rôle initiateur de la maladie.

#### 4.4 Arguments précliniques

À ces études conduites sur les patients et tissus post-mortem, s'ajoutent de nouveaux arguments issus de recherches précliniques récentes menées sur le cortex cérébral de souris transgéniques *SOD1*.

Des changements morphologiques et fonctionnels sont observés dans les NMCS dès les phases présymptomatiques chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*. En effet, la dégénérescence des dendrites apicales, des épines dendritiques et l'hyperexcitabilité neuronale ont été identifiées comme des caractéristiques précoces de l'atteinte de ces neurones dans les modèles murins analysés (Fogarty et al., 2015; Jara et al., 2012; Ozdinler et al., 2011; Saba et al., 2015).

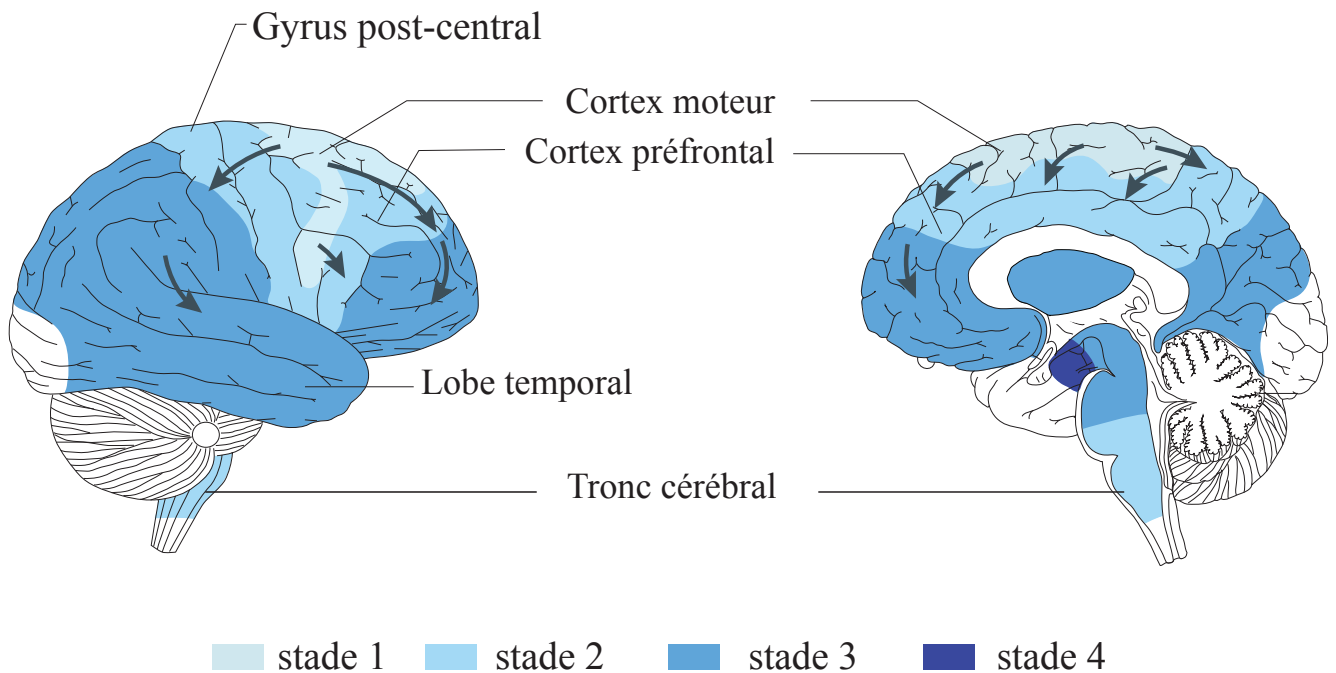


Figure 20. **Hypothèse de propagation de la pathologie TDP-43 selon un schéma de type corticofuge dans la SLA**

La propagation de la pathologie TDP-43 se ferait selon 4 stades. *Stade 1* : les lésions débuteraient dans le cortex cérébral, *Stade 2* : elles s'étendraient progressivement aux sites de projection des neurones corticaux excitateurs : le cortex préfrontal, le gyrus post-central et le tronc cérébral (le noyau rouge, la formation réticulée et les noyaux précérébelleux). *Stade 3* : puis vers d'autres aires préfrontales, des aires sensorielles post-centrales, le striatum présente des lésions. *Stade 4* : à ce stade, l'hippocampe est affecté (adaptée de (Braak et al., 2013)).

Afin d'aborder un rôle potentiel du cortex cérébral dans l'apparition et la progression de la SLA, une inhibition du transgène *SOD1<sup>G93A</sup>* a été réalisée par injection d'ARN *short hairpin* (ARNsh) dans le cortex moteur de rats transgéniques. Les auteurs ont montré que la diminution de l'expression de la protéine mutée SOD1, dans le cortex moteur uniquement, était suffisante pour retarder l'apparition de la maladie, prolonger significativement la survie des MnS et des JNM des rats transgéniques *SOD1<sup>G93A</sup>* (Thomsen et al., 2014). Si cette première approche n'a pas permis d'éliminer la protéine SOD1 mutée de la totalité du cortex cérébral ou d'une population cellulaire particulière, telle que les NMCS, elle a néanmoins permis de montrer que le cortex cérébral joue un rôle prépondérant dans l'apparition et la progression de la SLA, et est en faveur d'une étiologie corticale de la maladie. Ces données fournissent un argument supplémentaire en faveur de l'importance des processus pathogéniques corticaux dans la SLA.

Dans leur ensemble, ces données génétiques, cliniques, histopathologiques et précliniques, convergent en faveur d'une origine corticale de la maladie. Dans ce contexte, les NMCS représentent une population neuronale particulièrement pertinente, non seulement parce qu'ils dégénèrent au cours de la SLA, mais aussi et surtout en qualité d'intermédiaires uniques entre le cortex cérébral et le tronc cérébral et la moelle épinière. Ainsi, quels que soient les mécanismes responsables de leur dysfonctionnement initial, les NMCS pourraient être responsables de la transmission d'un « message neurodégénératif » (excitotoxicité, inclusion ou autre) depuis le cortex cérébral, selon un mécanisme antérograde (ou descendant).

**PROBLÉMATIQUE  
ET  
OBJECTIF DE LA THÈSE**



Comme nous avons pu le voir, parmi les neurones du cortex, les NMCS se distinguent par leur capacité unique à collecter, intégrer et transmettre les informations corticales vers le tronc cérébral et la moelle épinière. Ceci leur confère un rôle important d'initiateur et de modulateur de mouvements volontaires. Leur intégrité et leur bon fonctionnement sont donc indispensables pour l'exécution correcte de ces mouvements.

Dans la SLA, les NMCS dégénèrent conjointement avec les MnBS, conduisant à une altération de la motricité, à une paralysie progressive et au décès des patients. Malgré cette définition clinique et l'importance de la composante corticale pour l'exécution des mouvements, les recherches précliniques se sont jusqu'à présent surtout intéressées aux mécanismes de la dégénérescence des MnBS. Le manque d'études des NMCS relève notamment de l'absence de marqueurs moléculaires permettant de distinguer des populations neuronales corticales individuelles parmi l'hétérogénéité cellulaire du cortex. Cependant, le développement ces dernières années de nouveaux outils moléculaires issus des études du développement cortical offre la possibilité de les étudier précisément en conditions normales et pathologiques. Un petit nombre d'études ont ainsi pu être menées chez des modèles murins *SOD1*, et ont montré une perte des NMCS telle que rapportée chez les patients SLA, faisant de ces souris de bons modèles d'étude de cette population cellulaire.

En outre, les récentes études génétiques, d'imagerie et d'histopathologie des patients SLA suggèrent un rôle potentiellement initiateur du cortex dans la maladie. Face à l'absence de traitement curatif de la SLA et malgré les nombreuses études menées sur les MnBS, il apparaît nécessaire d'intégrer, à présent, l'étude du cortex et des NMCS dans les recherches précliniques menées sur la maladie. En dépit des différences anatomiques existantes entre la souris et l'homme, ces derniers présentent une similarité au niveau cellulaire, et notamment neuronale. Cela nous laisse présager que les études menées chez la souris sur les mécanismes de dégénérescence des NMCS permettront d'identifier ceux indispensables à leur survie, leur protection et leur maintien et pourraient être transposables à l'homme.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans un projet de recherche visant à étudier la contribution de la dégénérescence des NMCS à la pathophysiologie de la SLA. L'hypothèse de travail sur laquelle repose ce projet est que la dégénérescence spécifique des NMCS ne constitue pas un aspect secondaire de la SLA, mais contribue activement à son déclenchement et à sa progression. Dans ce contexte, mon travail de thèse avait un objectif double :

1) déterminer la dynamique spatio-temporelle de la perte des NMCS dans le modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>* et initier la caractérisation de la pathologie corticale qui l'accompagne, et 2) identifier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent leur dégénérescence sélective au cours de la maladie.

Pour répondre à ces objectifs :

- J'ai caractérisé la perte des NMCS dans le modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>* utilisé au laboratoire, par le biais de marquages rétrogrades. Pour ce faire, j'ai développé une technique de comptage permettant d'estimer soit la population globale, soit des sous-populations de NMCS. Avec l'aide de Mathieu Fischer, Assistant Ingénieur au laboratoire, j'ai également développé un plugin dans le logiciel ImageJ pour automatiser les comptages de NMCS (publication 1 en cours de rédaction, **partie I des résultats**).
- J'ai développé une approche expérimentale permettant, pour la première fois, de purifier les NMCS à partir de cerveaux individuels de souris adultes, en conditions physiologiques ou pathologiques (publication 2 « protocole » en cours de rédaction, **partie II des résultats**).
- J'ai purifié les NMCS de souris sauvages et *Sod1<sup>G86R</sup>*, à deux âges présymptomatiques et deux âges symptomatiques afin de conduire une large étude transcriptomique en RNA-seq et mettre en évidence, pour la première fois, les mécanismes moléculaires régissant leur dégénérescence (publication 1 en cours de rédaction, **partie I des résultats**).
- Parallèlement, j'ai débuté la comparaison des pathologies spinale (bien connue) et corticale (peu décrite) dans les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Pour cela, j'ai compilé les multiples données de la littérature afin de générer une liste de gènes candidats dont l'expression est connue pour être modifiée en conditions de SLA, dans les modèles murins et/ou chez les patients, afin de conduire des études d'expression génique puis d'histologie. Cette étude a pour objectif de mieux comprendre les changements moléculaires et cellulaires qui opèrent au sein du cortex cérébral lors de la dégénérescence des NMCS (premières données en vue d'un nouvel article, **partie III des résultats**).

Mon travail de thèse permettra de dégager, pour la première fois, les mécanismes moléculaires responsables de la dégénérescence des NMCS dans la SLA, et de mieux définir le microenvironnement dans lequel elle prend place. À plus long terme, ces travaux sont destinés au développement de stratégies thérapeutiques alternatives, dans le domaine de la SLA ainsi que d'autres maladies neurodégénératives affectant les NMCS.

En parallèle de ce travail, j'ai collaboré à deux projets :

- un projet développé par l'équipe d'Heather Durham (*Department of Neurology/Neurosurgery and Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec H3A 2B3, Canada*), portant sur le rôle du complexe de remodelage de la chromatine, nBAF (neuronal Brg1/Brm Associated Factor) dans l'attrition dendritique des MnS en réponse à l'expression de mutants de *FUS* ou de *TARDBP* (Tibshirani *et al.*, sous presse à *Human Molecular Genetics*) (Annexe 2)
- un projet développé par Luc Dupuis, au laboratoire, portant sur le rôle de la dégénérescence des neurones sérotoninergiques dans le développement de la spasticité dans la SLA (El Oussini *et al.*, sous presse à *Annals of Neurology*) (Annexe 3)

Les résumés de ces deux publications sont présentés en Annexe.

# RÉSULTATS

## 1. La perte précoce des neurones moteurs cortico-spinaux implique de nouveaux acteurs moléculaires dans la sclérose latérale amyotrophique

(Publication 1, en préparation)

L'état des lieux résumé précédemment a mis en avant un ensemble d'arguments en faveur d'un rôle initiateur du cortex cérébral dans la SLA (Eisen et al., 2017; Geevasinga et al., 2016). Seuls médiateurs de l'information motrice entre le cortex cérébral et la moelle épinière, les NMCS qui dégèrent dans la SLA pourraient jouer un rôle central dans l'apparition et la progression de la maladie. L'ensemble de ces considérations souligne la nécessité d'intégrer les NMCS dans les recherches précliniques qui jusqu'à présent ont fait l'objet de très peu d'études.

Basé sur l'hypothèse d'une contribution active des NMCS dans la maladie, ce travail de thèse a consisté, pour la première fois, à apporter une caractérisation précise de la dynamique spatio-temporelle de la perte des NMCS et à identifier les mécanismes moléculaires qui la soutiennent.

Afin de procéder à une caractérisation, des marquages rétrogrades des NMCS ont été réalisés chez les souris sauvages et *Sod1<sup>G86R</sup>* à deux âges présymptomatiques (60 et 75 jours) et deux âges symptomatiques (90 jours et stade final).

Une première évaluation de l'état de la population totale des NMCS a été réalisée par injection du Fluorogold (FG) au niveau de la partie cervicale de la moelle épinière où passent les axones des NMCS. Les NMCS FG-positifs présents sur 8 coupes espacées à intervalle régulier selon l'axe rostro-caudal, ont été comptés de manière automatisée grâce à un plugin que nous avons développé sur le logiciel ImageJ. Nos résultats montrent que les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* présentent une perte progressive des NMCS FG-positif devenant significative à partir de 90 jours (19%,  $p < 0,01$ ), et atteignant 33% ( $p < 0,001$ ) de perte au stade final de la maladie. Afin de confirmer ces résultats et de vérifier que la perte des NMCS FG-positifs observée n'est pas le résultat d'une altération du transport rétrograde du FG, une révélation par hybridation *in situ* du gène de la *mu-crystalline* (*Crym*), exprimé dans la couche V du cortex cérébral, et notamment par les NMCS a été réalisée. Une perte progressive des neurones *Crym*-positifs a été observée en accord avec nos résultats précédents. Par conséquent, l'ensemble de ces résultats indique que la diminution du nombre de NMCS FG-positifs est le résultat d'une perte progressive des NMCS chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* au cours de la maladie et non uniquement d'une incapacité à transporter le FG des terminaisons axonales vers les corps cellulaires.

L'analyse plus précise de la distribution de la population totale des NMCS le long de l'axe rosto-caudal a révélé que la dégénérescence des NMCS est inégale le long de cet axe, débutant au niveau des régions les plus caudales à 90 jours puis se propageant vers les régions plus rostrales au stade final de la maladie. Des études ont montré que ces régions caudales se composent de NMCS projetant sur les MnS lombaires (NMCS<sub>Lomb</sub>) innervant les membres postérieurs (Kamiyama et al., 2015). Par conséquent, nous avons voulu savoir si la perte neuronale observée dans les régions caudales correspond à cette sous-population neuronale. Pour cela, une deuxième série d'injections de FG a été réalisée dans la partie lombaire de la moelle épinière aux mêmes âges que précédemment. La quantification des NMCS<sub>Lomb</sub> indique une perte plus importante et plus précoce que le reste de la population, significative dès 60 jours.

Sachant que les souris *Sod1*<sup>G86R</sup> développent les premiers symptômes au niveau de ces membres, nous avons ensuite testé l'existence d'une possible relation somatotopique entre les atteintes corticales, spinales et musculaires. La comparaison de la perte des NMCS<sub>Lomb</sub>, des MnS lombaires et de l'état des JNM a été réalisée et a montré une perte des NMCS<sub>Lomb</sub> bien avant l'atteinte des MnS lombaires. En effet, celle-ci, évaluée par le biais d'analyses fonctionnelles (EMG) et histologiques (MnS et JNM), n'est observée significative qu'au stade final de la maladie.

Dans leur ensemble, ces données montrent que, chez les souris *Sod1*<sup>G86R</sup>, la dégénérescence des NMCS se produit selon une relation somatotopique telle que décrite dans un petit nombre d'études portant sur les patients SLA (Mochizuki et al., 1995; Ravits & La Spada, 2009; Zhang, Mao, et al., 2014). De plus, la comparaison de la dynamique spatio-temporelle de la dégénérescence des NMCS<sub>Lomb</sub> au cours de la maladie à celle des MnS indique que les NMCS seraient affectés bien avant les MnS. Cela suggère que dans la SLA, la dégénérescence pourrait se propager de manière descendante, du cortex cérébral vers la moelle épinière et souligne donc le rôle primordial des NMCS dans la pathologie SLA et la nécessité d'identifier les mécanismes qui sous-tendent leur dégénérescence.

Afin de mettre en évidence les signalisations moléculaires qui régissent la dégénérescence des NMCS, ces derniers ont été purifiés à partir du cortex cérébral de souris *Sod1*<sup>G86R</sup> et de leurs contrôles sauvages à deux âges présymptomatiques (30 et 60 jours) et deux âges symptomatiques (90 et 105 jours). Une population contrôle de NCP qui ne dégénère pas au cours de la maladie, a été purifiée en parallèle, et les deux populations neuronales ont été soumises au séquençage de leurs ARN (RNA-seq). Les gènes communs à l'analyse des NCP ont été ensuite retirés de la liste de gènes issue de l'analyse des NMCS afin de ne conserver que les gènes dont le changement d'expression est spécifique aux NMCS et potentiellement impliqués dans leur dégénérescence spécifique.

L'analyse statistique des données de RNA-seq, a permis de mettre en évidence des dérégulations transcriptomiques dès l'âge présymptomatique de 30 jours, avant même l'observation d'une perte des NMCS, puis s'amplifiant aux stades symptomatiques en accord avec la dégénérescence des NMCS détectée. Ces dérégulations conduisent à un enrichissement en gènes impliqués dans les processus de survie, de mort, ou encore de réponse immunitaire et neuroinflammatoire. La population contrôle des NCP présente, quant à elle, un nombre de gènes dérégulés relativement faible et constant au cours de la maladie, en accord avec l'absence de dégénérescence de cette population neuronale (Ozdinler et al., 2011). Différents profils d'expressions géniques ont pu être observés reflétant différentes réponses cellulaires face au processus de dégénérescence tels que la mise en place de mécanismes de mort cellulaire ou de survie par l'expression de gènes développementaux. Sur la base de leur profil d'expression, de leur pertinence fonctionnelle et des données de la littérature, une première liste de gènes candidats a été établie aux âges présymptomatiques. Parmi ces premiers candidats, certains gènes avaient déjà été mis en cause dans un contexte de SLA, par le biais d'analyses similaires conduites sur les MnBS tels que le gène *Scn1b*. D'autres en revanche n'ont auparavant jamais fait l'objet d'un lien avec la maladie. Ces derniers pourraient permettre de dégager des signalisations moléculaires précoces conduisant au dysfonctionnement initial, à la dégénérescence progressive et à la perte ultime des NMCS. La validation de ces gènes candidats sur tissu murin est actuellement en cours.

Après validation sur tissus murins et humains, les meilleurs candidats seront soumis à des analyses fonctionnelles dans des modèles simplifiés *in vitro* et *in vivo* chez le rongeur, par des approches de gain ou perte de fonction et/ou des approches pharmacologiques afin de comprendre leur implication dans la mort des NMCS. À plus long terme, ces études ont pour but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur le maintien d'une population saine et fonctionnelle de NMCS.

## **Presymptomatic corticospinal motor neuron loss involves a new set of early molecular players in amyotrophic lateral sclerosis**

Christine Marques<sup>1</sup>, Mathieu Fischer<sup>1</sup>, Jelena Scekcic-Zahirovic<sup>1</sup>, Thibaut Burg<sup>1</sup>, Anaïs Streit<sup>1</sup>, Céline Keime<sup>2</sup> and Caroline Rouaux<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm UMR\_S 1118, Université de Strasbourg; Faculté de Médecine; Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Inserm UMR\_S 964, CRNS UMR\_S 7104, Université de Strasbourg; IGBMC; Strasbourg, France.

\* corresponding author: [caroline.rouaux@inserm.fr](mailto:caroline.rouaux@inserm.fr)



### ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is clinically defined as the combined degeneration of the corticospinal and corticobulbar motor neurons (CSMN) along with the bulbar and spinal motor neurons (SMN). While a growing body of evidence points to the cerebral cortex as the potential initiation site of ALS, little is known about the spatiotemporal dynamics of CSMN degeneration, and the molecular pathways involved. Here, we used retrograde labelling in combination with rigorous sampling and counting of either the whole CSMN population or only the lumbar-projecting CSMN and showed that in *Sod1<sup>G86R</sup>*, CSMN loss occurs in a somatotopic manner and precedes motor symptom appearance and SMN degeneration. To gain insights into the molecular mechanisms that selectively trigger CSMN degeneration, we purified adult CSMN from the cerebral cortex of healthy or diseased mice and conducted a time course of RNA sequencing analysis from early presymptomatic ages to the end stage of the disease. The results identify new and early molecular players in ALS, and provide a foundation for the development of therapeutic approaches based on the maintenance of healthy and functional CSMN.

## INTRODUCTION

In clinics, ALS is described as the combined degeneration of bulbar and spinal motor neurons (SMN, or lower motor neurons) and corticospinal and corticobulbar motor neurons (CSMN, or upper motor neurons). If SMN degeneration, which ultimately leads to respiratory muscle failure, is recognized as the main cause of death in ALS, the cause of SMN degeneration itself remains an unresolved question, and the attempts to promote SMN survival have failed to translate into successful therapies for ALS patients.

ALS presents with both sporadic and familial forms. *SOD1*, which encodes the Cu-Zn superoxide dismutase 1, was the first gene linked to ALS, and accounts for about 12% of the familial cases<sup>1-3</sup>. Its discovery enabled the development of multiple animal models that largely contributed to the discoveries of the molecular pathways involved in SMN degeneration and more broadly spinal pathology<sup>4,5</sup>.

Yet, a growing body of evidence from the genetics, clinics and pathology of patients, along with first preclinical studies, point to the cerebral cortex as a potential site of initiation of the disease<sup>6,7</sup>. Recent genetic data have established a clear link between ALS and frontotemporal dementia (FTD), a neurodegenerative disease that affects the frontal and temporal cortices and results in behavioural and cognitive deficits. Indeed, several common genes have been identified as mutated in ALS and FTD familial cases, and a significant proportion of ALS and FTD patients present, over time, with overlapping symptoms of both diseases<sup>8</sup>. In addition, the vast majority of ALS patients, whether of familial or sporadic origin, and as much as 45% of FTD patients present with TDP-43 pathology, *i.e.* toxic intra-cytoplasmic inclusions of the phosphorylated form of the TDP-43 protein<sup>8</sup>. Together, genetic, clinical and pathological data have linked ALS and FTD, currently seen as the two extremes of a single clinical continuum, with identified common denominators amongst which is a shared affected region of the central nervous system, the cerebral cortex.

Extensive examination of the TDP-43 pathology in post-mortem brains from ALS patients has shown that the motor cortex is the most affected region of the brain, along with the brain stem and spinal cord<sup>9</sup>. Importantly, the intensity of the pathology seems to follow a sequential spreading pattern, arising from the motor cortex and progressing to the projection sites of excitatory cortical projection neurons, according to the so-called corticofugal hypothesis<sup>9,10</sup>. Longitudinal diffusion tensor imaging analyses have since then confirmed the corticofugal hypothesis in patients<sup>11</sup>, pointing to the motor cortex as the first affected region in ALS.

Both sporadic and familial ALS patients present with early cortical hyperexcitability<sup>12</sup>. Longitudinal studies in presymptomatic *SOD1* mutation carriers revealed that the cortical hyperexcitability develops prior to the clinical onset of ALS<sup>13</sup> and has been suggested as responsible for the glutamatergic excitotoxicity that characterizes the disease<sup>14</sup>, and for the degeneration of SMN via an anterograde transsynaptic mechanism<sup>12</sup>.

## RESULTATS

Finally, a knock-down of the pathogenic *SOD1*<sup>G93A</sup> in the motor cortex of transgenic rats has been reported as sufficient to significantly extend the survival of transgenic rats<sup>7</sup>, demonstrating for the first time the involvement of the cerebral cortex in ALS.

Altogether, this growing amount of evidence points to the cerebral cortex as a starting point of ALS. In this context, the CSMN, as the appointed intermediary between the cerebral cortex and the spinal cord, appear as particularly relevant to disease onset and progression. While a limited number of studies reported on the specific degeneration of CSMN in *SOD1* mouse models<sup>15,16</sup>, little is known about its exact spatiotemporal dynamics, and the molecular mechanisms involved in CSMN initial dysfunction, progressive degeneration and ultimate loss.

## RESULTS

### The population of CSMN progressively degenerates in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice

To test whether *Sod1<sup>G86R</sup>* mice recapitulate a progressive loss of CSMN, we performed a series of retrograde labelling of the whole CSMN population by the injection of Fluorogold from the cervical portion of the spinal cord of wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, at two presymptomatic ages of 60 days (60d: n=5 WT and 6 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and 75 days (75d: n=6 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and two symptomatic ages of 90 days (90d: n=5 WT and 6 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and 105 days (105d: n=5 WT) or end stage (ES: n=5 *Sod1<sup>G86R</sup>*) (Fig. 1a). Microscopic analysis of coronal sections revealed labelled pyramidal cells located in the cerebral cortex, spanning from Bregma 2.10 mm to Bregma -1.70 mm (Supplementary Fig. 1). Analysis of one rostro-caudal level Bregma 0.74 mm, revealed labelled cells located in the layer V of the cerebral cortex, spanning from the secondary motor cortex medially to the primary somatosensory cortex laterally (Fig. 1b), in both wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* animals. Importantly, we observed a marked decrease of labelled CSMN in the cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice over time (Fig. 1b,c).

To measure the gradual loss of the whole population of labelled CSMN in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, we quantified the number of CSMN present in both hemispheres of eight equally spaced coronal sections along the rostro-caudal axis and matched between the two genotypes (Supplementary Fig. 1), using a plugin of the ImageJ software that we developed for the need of this study (Supplementary Fig. 2, and Methods). The results show that the population of retrogradely labelled CSMN progressively decreased over time in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals compared to their wild type littermates (Fig. 1d). This decrease became significant at the symptomatic age of 90 days, and reached a loss of 33.3% by the end of the disease (60d: 2,904.5 ± 88.3 for *Sod1<sup>G86R</sup>* vs 3,176.0 ± 102.7 for WT; 75d: 2,703.7 ± 88.6 vs 3,057.3 ± 168.5; 90d: 2,635.3 ± 77.6 vs 3,255.8 ± 135.8; ES/105d: 2,180.4 ± 151.3 vs 3,271.4 ± 52.0; Fig. 1d).

To confirm these results and exclude that the loss of CSMN could be due to a defective retrograde transport of Fluorogold by the axons of the *Sod1<sup>G86R</sup>* CSMN, we took advantage of the selective expression of the *mu-Crystallin* gene (*Crym*) by the CSMN, along with other excitatory projection neurons of the cortical layer V<sup>17</sup>. *In situ* hybridization for *Crym* followed by quantification (Supplementary Fig. 3), at one single rostro-caudal level (Bregma 0.14 mm) and within the layer V of the secondary and primary motor and the most medial primary sensorimotor areas only, at 60d (n=3 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 90d (n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 105d (n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and 115d/ES (n=3 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*), revealed a progressive decline of *Crym*-positive neurons in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice compared to their wild type littermates (90d: 86.1% ± 2.9; 105d: 69.2% ± 8.9; ES: 52.9% ± 9.4 relative to the corresponding WT population; Supplementary Fig. 3). Altogether, while the data do not rule out the possibility that retrograde transport may be affected in CSMN over time, they indicate that the decline of Fluorogold-labelled CSMN is not solely the result of a defective uptake or transport of the tracer, and, together with the decrease of *Crym*-positive neurons in areas where CSMN are located, rather reflect the progressive loss of this neuronal population in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice over time.

### CSMN degeneration spreads in a caudo-rostral manner in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice

CSMN are topographically organized along the rostro-caudal and the medio-lateral axes, and project accordingly to different portions of the spinal cord<sup>18–20</sup>. Sampling the whole population of CSMN along the rostro-caudal axis (Supplementary Fig. 1) enabled to test whether their degeneration was homogeneous, or rather affected more selectively sub-populations. We thus quantified the number of CSMN present on each of the eight selected coronal sections (Fig. 2) of wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* brains over time. Using this approach, we observed that the number of CSMN was uneven along the rostro-caudal axis, and that CSMN were overall more numerous in the most caudal sections (Fig. 2 and Supplementary Fig. 1). At the presymptomatic ages 60d and 75d, *Sod1<sup>G86R</sup>* brains displayed less CSMN than their wild type counterparts, at every level analysed, but no significant difference could be detected between the two genotypes (Fig. 2). At 90d, we observed a significant reduction of CSMN in the caudal sections only, and this reduction was uneven amongst these sections, with a greater decrease observed at the most caudal levels (section 5: 11.86% loss; 6: 19.23%; 7: 19.21%; 8: 29.59%; 9: 28.43%; Fig. 2). At 105d, with the exception of section 3, the loss of CSMN was significant at every level. Within the caudal part, section 9 remained the most severely affected, with a loss of 44.48%, but overall, the most impacted section was the rostral section 2, with a loss of 68.67% (Fig. 2). Together, the data show that CSMN degeneration is not even along the rostro-caudal axis in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, starts with the most caudally located ones, and progresses rostrally over time.

### Loss of lumbar-projecting CSMN occurs prior to lumbar spinal motor neuron degeneration

Because CSMN that innervate the hind limbs are mostly located caudally<sup>18</sup>, we reasoned that they might account for the majority of the neuronal loss observed in the most caudal sections we analysed. To test this hypothesis, we performed a second set of retrograde labelling and injected Fluorogold from the lumbar portion of the spinal cord of wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, at the same presymptomatic ages (60d: n=4 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 75d: n=4 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and symptomatic ages (90d: n=5 WT and 5 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 105d: n=4 WT and ES: n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) (Fig. 3a). Microscopic analysis of coronal sections revealed labelled cortical cells, spanning from Bregma -0.46 mm to Bregma -1.70 mm (Supplementary Fig. 4). Each of the three levels considered showed a marked loss of CSMN from 60 days on (section 8, Bregma -1.06 mm, Fig. 3, and sections 7 and 9, Bregma -0.46 and -1.70 mm respectively, data not shown). Sampling and counting the lumbar-projecting CSMN revealed a marked loss of this subpopulation in the *Sod1<sup>G86R</sup>* mice compared to their wild type littermates, which was significant from 60 days on and progressed over time (60d:  $656.3 \pm 16.2$  for *Sod1<sup>G86R</sup>* vs  $750.3 \pm 27.0$  for WT; 75d:  $591.7 \pm 52.9$  vs  $788.5 \pm 17.6$ ; 90d:  $499.2 \pm 30.8$  vs  $810.5 \pm 16.8$ ; ES/P105:  $509.8 \pm 76.0$  vs  $810.5 \pm 16.8$ ; Fig. 3b). Altogether, the data show that in the *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, lumbar-projecting CSMN start degenerating earlier, and to a greater extent than the overall CSMN population.

The paralysis, which progressively affects the *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, typically starts in the hind limbs. In accordance with this, spinal motor neurons (SMN) were shown to degenerate in the lumbar portion of

the spinal cord<sup>21,22</sup>. In order to compare the time course of lumbar-projecting CSMN degeneration to that of lumbar SMN, we counted the number of ChAT-positive neurons present in the ventral horn of the lumbar spinal cord of wild type and *Sod1*<sup>G86R</sup> animals over time (60d: n=5 WT and 6 *Sod1*<sup>G86R</sup>; 75d: n=6 WT 3 *Sod1*<sup>G86R</sup>; 90d: n=5 WT and 6 *Sod1*<sup>G86R</sup>; 105d/ES: n=5 WT 5 *Sod1*<sup>G86R</sup>; Fig. 3d,e,f). We failed to detect any significant difference between *Sod1*<sup>G86R</sup> and wild type mice before the end stage of the disease ( $15.3 \pm 0.3$  vs  $19.3 \pm 0.6$  respectively, corresponding to a loss of 20.7%; Fig. 3e). To exclude the contribution of gamma motor neurons that do not degenerate during the course of ALS, and to restrict the counting to large, alpha motor neurons, we next counted the number of large ( $400 \mu\text{m}^2$  or above) ventral ChAT-positive neurons (Fig. 3f). We observed an important and significant loss of large ChAT-positive neurons at end stage of the disease (65.27%,  $p < 0.001$ ), and a milder and non-significant loss at 90 days of age (19.19%,  $p = 0.237$ ). Together, the data suggest that lumbar SMN degenerate late during the course of the disease, and that their degeneration does not involve a massive neuronal loss, but rather the shrinkage of their somas.

SMN degeneration in mutant *Sod1* mouse models of ALS follows a Wallerian progression, starting from the neuromuscular junction and progressing retrogradely to the soma<sup>23</sup>. To determine when lumbar SMN degeneration starts, we performed electromyographic recordings in the gastrocnemius (data not shown) and the tibialis anterior (Supplementary Fig. 5a,b) muscles of both hind limbs of *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, prior to their harvesting. Using this technique, neuromuscular junction denervation was evident on 100% of end stage animals, and 66.66% of 90 day-old animals, but not on younger animals (Supplementary Fig. 5a,b). To confirm these results, we investigated the status of the neuromuscular junctions of the tibialis anterior muscle by immunofluorescence (Supplementary Fig. 5c,d). In both wild type and *Sod1*<sup>G86R</sup> animals we observed healthy and innervated neuromuscular junctions, along with a small proportion of partly denervated neuromuscular junctions that displayed discrete disconnections of the axonal terminal (Supplementary Fig. 5d). The proportion of partly denervated neuromuscular junctions was stable across ages and genotypes (Supplementary Fig. 5c), indicating that their occurrence likely reflects a mild alteration of the tissue during the process of bundles preparation. Importantly, in *Sod1*<sup>G86R</sup> animals only, we detected fully denervated junctions that had lost their axonal terminal (Supplementary Fig. 5d). This phenotype was present only from 90 days on, and progressed over time (17.7% of *Sod1*<sup>G86R</sup> mice at 90 days, 76.9% at end stage, Supplementary Fig. 5c). Thus, the data indicate that lumbar SMN degeneration starts after 75 days of age in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice.

Taken together, the data show that in a mouse model of ALS where paralysis starts in the hind limbs, CSMN degeneration occurs in a somatotopic manner, with lumbar-projecting CSMN affected earlier and to a greater extent than the rest of the CSMN population. In addition, the data indicate that CSMN loss occurs before the appearance of the first signs of SMN degeneration. The spatiotemporal dynamics of CSMN degeneration during the course of the disease in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice suggests that CSMN are likely affected before the SMN, and highlights their clinical relevance.

### **Purification of adult CSMN under healthy and neurodegenerative conditions**

In order to start deciphering the molecular mechanisms that govern CSMN degeneration, we compared the gene expression profiles of CSMN purified from the cerebral cortex of adult wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. CSMN were retrogradely labelled by injecting green fluorescent microbeads into the cervical portion of the dorsal funiculus at 25 days of age (Fig. 4a,b). Animals were harvested at two presymptomatic ages, 30 and 60 days, and two symptomatic ages, 90 and 105 days (Fig. 4b). CSMN were microdissected, dissociated and purified by fluorescence-activated cell sorting (FACS) (Supplementary Fig. 6a). In parallel, a second population of cortical neurons, the callosal projection neurons (CPN) located in the layers II/III of the cerebral cortex, above the labelled CSMN, were also purified (Fig. 4a and Supplementary Fig. 6a). CPN and CSMN are close neuronal populations that share many features: they arise from a same pool of cortical progenitors, are excitatory projection neurons and use the glutamate as a neurotransmitter, extend axons far away from their somas and express some common molecular markers. Yet, as opposed to CSMN, CPN do not degenerate in ALS, and CPN from *Sod1<sup>G86R</sup>* mice remain unaffected in spite of the ubiquitous transgene overexpression (data not shown). We thus reasoned that the comparison between the two neuronal populations would enable us to distinguish genes deregulated in CSMN only, and likely to be involved in their degeneration, from genes deregulated in both CSMN and CPN, and likely to not have a detrimental effect on neuronal survival. Importantly, CSMN and CPN were purified from the same animals. qPCR (data not shown) and RNA sequencing (RNAseq) analyses (Supplementary Fig. 6b) confirmed that purified CSMN expressed typical markers of cortical layer V subcerebral projection neurons such as *Bcl11b*, *Crym*, *Fezf2*, *Ntng1* and *Pcp4*, and did not express typical upper layer projection neuron markers such as *Cux1*, *Cux2*, *Lhx2*, *Plxnd1* or *Ptn*<sup>17,24,25</sup> (Supplementary Fig. 6b). Conversely, CPN expressed typical cortical upper layer projection neuron markers, and not cortical layer V subcerebral projection neuron markers (Supplementary Fig. 6b).

### **RNAseq analysis reveals early transcriptional alterations that increase as CSMN degenerate**

The comparison between WT and *Sod1<sup>G86R</sup>* CSMN samples revealed respectively 25 and 42 significantly up- and down-regulated genes at 30 days, 6 and 36 up- and down-regulated genes at 60 days, 333 and 424 up- and down-regulated genes at 90 days, and 55 and 194 up- and down-regulated genes at 105 days of age (Fig. 4c). The comparison between WT and *Sod1<sup>G86R</sup>* CPN samples revealed respectively 52 and 82 up- and down-regulated genes at 30 days, 15 and 18 up- and down-regulated genes at 90 days, and 27 and 33 up- and down-regulated genes at 105 days of age (Fig. 4c). Comparisons between the two neuronal populations at each age revealed few common genes: 2 up-regulated genes at 30 days, 3 up- and 3 down-regulated genes at 90 days and 1 up and 1 down-regulated genes at 105 days (Fig. 4c). Together, the data show that significant transcriptional deregulations occur selectively in CSMN at presymptomatic ages, and as early as 30 days. They become much more numerous when degeneration becomes detectable at the level of the whole CSMN population, at 90

days of age, and remain considerable in the later symptomatic age of 105 days. In comparison, CPN transcriptional deregulations remain modest at all ages analysed. Importantly, very few common genes are found between the two neuronal populations, confirming the absence of degeneration of the CPN population and suggesting that the two neuronal populations cope differently with the overexpression of the mutant *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene.

To obtain insights into the mechanisms of CSMN degeneration, we conducted gene ontology (GO) analysis for biological processes on the genes selectively deregulated in CSMN only (Fig. 4d). The 30 days and 60 days lists were too short to return results in GO. Analysis at 90 days resulted in one single category, the single-organism metabolic process that comprised 99 genes and had a fold enrichment of 1.58 (Fig. 4d). Gene ontology (GO) analysis for cellular components revealed the involvement of the cytoplasm, intracellular, and intracellular membrane-bound organelles, the endoplasmic reticulum and extracellular organelles, vesicles and exosome (data not shown). Together, the data reflects important alterations in cellular functions, in accordance with the degeneration that takes place in CSMN at this age. At 105 days, GO analysis for biological processes returned the involvement of four major processes (Fig. 4d). The first two categories, positive regulation of biological processes (79 genes, fold enrichment of 1.68) and regulation of response to stimulus (54 genes, fold enrichment of 1.85) included genes involved in inflammation and immune response, such as chemokines, antigens, stimulator of interferon and members of the complement (data not shown). In the third and fourth categories, regulation of multicellular organismal process (50 genes, fold enrichment of 2.08) and single-organism process (142 genes, fold enrichment of 1.33), most of the genes were found in relation to development (Fig. 4c). Together, the data suggest that as CSMN degeneration progresses, neuroinflammation and immune response may be induced, and developmental processes may be reactivated.

### **RNAseq analysis reveals various patterns of transcriptional regulations**

Next, we separated the up- from the down-regulated CSMN-specific differentially regulated genes and compared them across ages (Fig. 5a). With the threshold initially set up, we found few common genes across ages. Yet, the hierarchical clustering of the CSMN gene expression profiles by the z-score represented on heatmaps, revealed subgroups of genes amongst the up- and down-regulated genes (Fig. 5b). Three main profiles that could be identified amongst the up-regulated genes are: genes similarly up regulated at all ages, as illustrated by *Emb*, *Fgf9*, *Gmpr*, *Nrip3*, *Parm1* or *Tekt 5* (Fig. 6a); genes with increased expression over time, such as *Adamts15*, *Lhfp15* or *Tmem74* (Fig. 6b); genes with decreased expression over time, such as *Amn*, *Postn* or *Tspan17* (Fig. 6c). Such dynamics may also exist between the down-regulated genes, but were more difficult to identify with the chosen method of analysis. We identified mostly genes that displayed constant down-regulation such as *Fnbp1l*, *Ndst3* and *Prss12* (Fig. 6d).



**Confirmation of *Scn1b* early up-regulation by immunofluorescence**

To confirm the RNAseq results, we undertook a series of validations by histological approaches, using *in situ* hybridization and immunohistochemistry (data not shown) or immunofluorescence (Fig. 7) on wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* brains. Amongst genes of interest, *Scn1b* was found significantly up-regulated at both 30 and 60 days of age in *Sod1<sup>G86R</sup>* CSMN compared to wild type CSMN, and while its expression decreased over time in transgenic samples, it remained greater than in wild type samples at all ages considered (Fig. 7a). To confirm *Scn1b* up-regulations in CSMN for *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, we ran an immunofluorescence on brain coronal sections from 60 day-old wild type (n=6) and *Sod1<sup>G86R</sup>* (n=6) animals. SCN1B was found at low levels in the cerebral cortex of wild type mice and was more easily detected medially in the retrosplenial cortex and in the layer V of the neocortex laterally (Fig. 7b), confirming the higher expression in CSMN versus CPN observed by RNAseq (Fig. 7a). In transgenic animals, SCN1B expression was overall higher than in their wild type counterparts. Closer examination of the layer V revealed SCN1B expression in the cytoplasm of large cells, and a large increase of expression in cortical layer V from *Sod1<sup>G86R</sup>* brains compared to their wild type littermates. Importantly, co-localization with DAPI revealed that in *Sod1<sup>G86R</sup>* brains, SCN1B expression was found in cells presenting either healthy (Fig. 7b, arrows) or pyknotic nuclei (Fig. 7b, arrowheads), while only healthy nuclei could be detected within the wild type layer V SCN1B-positive cells. Taken together, these data confirms that *Scn1b* is up-regulated in *Sod1<sup>G86R</sup>* CSMN at presymptomatic ages, and that its increased expression correlates with neurodegeneration.

## DISCUSSION

Here, we report that CSMN degeneration and loss start very early in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, prior to SMN first signs of degeneration, and occur in a somatotopic manner. In addition, we show that excitatory neuron populations can be purified from individual adult mouse cerebral cortex under healthy and diseased conditions, and be transcriptionally profiled by RNAseq. Comparison between genes found deregulated in *Sod1*<sup>G86R</sup> CSMN and CPN at various pre- and symptomatic ages enabled to identify genes selectively deregulated in CSMN only, and likely to be involved in their specific degeneration.

CSMN degeneration, along with SMN degeneration, is a *sine qua non* condition to diagnose ALS. In clinics, CSMN dysfunction and degeneration translate into slowness of motion, clonus, hyperreflexia, the Babinski sign and spasticity<sup>6,14</sup>. These symptoms are extremely difficult to assess in rodents. To circumvent this difficulty, CSMN degeneration in animal models has been assessed by histology. Zang and Cheema (2002) were the first authors to apply retrograde labelling techniques and showed that *SOD1*<sup>G93A/G1H</sup> mice recapitulate CSMN degeneration<sup>15</sup>. These data were confirmed in the *SOD1*<sup>G93A</sup> mouse model by Ozdinler and collaborators (2011) who also demonstrated the decrease of multiple layer V subcerebral projection neuron-specific markers<sup>16</sup>. These first studies demonstrated that mutant *SOD1* mouse models of the disease recapitulated CSMN degeneration as observed in post-mortem tissues<sup>6,14</sup>. Here, we first employed retrograde labelling to show that mice overexpressing a mutant of the murine *Sod1* gene also display progressive loss of CSMN (Fig. 1). We confirmed these results by showing that the motor areas of *Sod1*<sup>G86R</sup> mice present with decreased numbers of cortical layer V *Crym*-positive neurons over time in comparison with controls (Supplementary Fig. 3). Importantly, RNAseq analysis of purified CSMN revealed that *Crym* expression is maintained over time in CSMN, in both wild type and *Sod1*<sup>G86R</sup> conditions, ruling out the possibility that the progressive diminution of *Crym*-positive neurons in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice could result from a decreased expression of its mRNA. Together, the Fluorogold and *Crym*-positive neurons counting enabled to conclude that CSMN cell bodies progressively disappear from the brain of *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, and that this is not due only to potential affected retrograde transport or to the decreased expression of selective markers.

As opposed to the former studies, we developed an approach to sample the whole CSMN population. This enabled to demonstrate that CSMN loss is not even along the rostro-caudal axis and affects primarily the caudally located ones (Fig. 2), suggesting that CSMN degeneration may occur in a somatotopic manner. Indeed, CSMN are organized topographically along the rostro-caudal and medio-lateral axes both in human<sup>26,27,28</sup> and in rodents<sup>18,19,29</sup>. In mice, most of the caudally located CSMN innervate the hind limbs via projections to the lumbar portion of the spinal cord<sup>18</sup>. Interestingly, similarly to mutant SOD1 patient carriers who present with first motor symptoms in the legs<sup>30</sup>, *Sod1*<sup>G86R</sup> mice develop first motor symptoms in the hind limbs<sup>21,22</sup> in which muscles are innervated by SMN located in the lumbar portion of the spinal cord. Retrograde labelling of lumbar projecting CSMN

(Fig. 3) revealed an early, marked and progressive decrease in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice compared to their wild type littermates, demonstrating that this murine model also recapitulates the somatotopic relationship between the impaired body regions and the affected cortical areas, which characterizes the disease in patients<sup>31-33</sup>, and this, in spite of the differences between the mouse and human corticospinal tract organization and projections within the spinal cord.

A growing body of recent evidence points to the cerebral cortex as a starting point of ALS in patients. As appointed intermediary between the cerebral cortex and the spinal cord, the CSMN may convey neurodegeneration from the brain to the spinal cord. How this transmission would occur remains an open question. Another possibility would be that a minimal number of properly functioning CSMN is mandatory for SMN function and survival. Here, we show that lumbar-projecting CSMN are lost in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice long before the appearance of the motor symptoms (Fig. 3 and Supplementary Fig. 5). It is thus possible that SMN degeneration simply arise when the spinal neurons cannot cope any more with the progressive loss of upstream CSMN. It would thus be particularly interesting to test this hypothesis by determining how SMN would behave in response to an experimentally induced selective death of CSMN.

Transcriptomics, amongst other techniques, has largely contributed to our understanding of the molecular pathways leading to SMN degeneration (reviewed in<sup>34-36</sup>), and will likely largely contribute to our understanding of the molecular mechanisms behind CSMN degeneration as well. With this in mind, we sought to decipher the transcriptomic alterations that progressively take place in CSMN as they degenerate in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice. To this end, we adapted a method of purification of cortical excitatory neuron populations developed by researchers in the field of corticogenesis<sup>17</sup> to the field of neurodegeneration (Fig. 4 and Supplementary Fig. 6). We thus purified CSMN and CPN from the cerebral cortex of wild type and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice at various adult ages, corresponding to pre- and symptomatic ages, and conducted RNAseq analysis. To our knowledge, this is the first report on cortical projection neuron purification by FACS from the adult mouse brain. In addition, this new technique offers the advantage to use the neurons of a single mouse brain as one true replicate, instead of pooling together the neurons from several animals<sup>17,37</sup>, providing an adapted response to ethical requirements related to animal numbers and to statistical analysis requirements. Importantly, the use of purified neurons as opposed to whole tissue, in this case the whole cerebral cortex or the whole cortical motor areas, insures to unravel CSMN-specific genes that may not come out of whole tissue analysis. While the whole tissue could have been used as control, as this has been done for instance to highlight SMN-specific deregulated genes from the rest of the spinal cord of ALS patients versus controls<sup>38</sup>, we have chosen instead the CPN as control. Indeed, the cerebral cortex is composed of up to 80% of glutamatergic excitatory projection neurons amongst which CSMN constitute only a discrete neuronal population. In a mouse model where mutant *Sod1* gene is ubiquitously overexpressed, it is likely that common deregulated genes may be found across multiple cortical excitatory neuronal populations,

whether or not they degenerate during the course of ALS.

Comparison amidst CSMN-specific and CPN-specific deregulated genes between wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, at pre- and symptomatic ages enabled to identify genes that may be central to selective CSMN degeneration in the context of ALS. Interestingly, we found that the numbers of CPN-specific deregulated genes remain constant over time (Fig. 4c), in accordance with the maintenance of this neuronal population in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (data not shown). The numbers of CSMN-specific deregulated genes instead increases with time to peak at 90 days of age (Fig. 4c), which corresponds to the age at which a significant decrease of CSMN numbers, can be monitored in these animals (Fig. 1), reflecting, as expected, major transcriptional alterations taking place when neurodegeneration starts affecting the whole CSMN population. Temporal analysis of the CSMN-specific deregulated genes revealed different profiles (Fig. 5,6). Specifically, amongst the up-regulated ones, we identified three main temporal profiles: genes similarly up-regulated at all four time points, genes up-regulated at early time points and decreasing over time, and genes which expression increases with time. These may reflect *i*) a cell-type specific effect of constant overexpression of the mutant *Sod1* gene, *ii*) an overall decreased survival or increased degeneration of the whole CSMN population, *iii*) potential attempts of CSMN to counteract degeneration, potentially by re-expressing developmental genes (Fig. 4d). Interestingly, few numbers of genes are found specifically deregulated in CSMN at the presymptomatic ages of 30 and 60 days (Fig. 4c). Amongst them, some might be responsible for the initial dysfunction, progressive degeneration and ultimate death that affect CSMN over time. This might be the case of *Scn1b* (Fig. 7) that we found up-regulated in CSMN at the transcriptional level (Fig. 7a) and at the protein level (Fig. 7b). *Scn1b* encodes the sodium voltage-gated channel beta-subunit 1, and has been linked to epilepsy and cardiac diseases<sup>39</sup>. Voltage-gated sodium channels are multimeric protein complexes essential for the action potential generation, and consist of a central pore-forming alpha-subunit and two beta-subunits. Sodium channel beta-1 subunits modulate channel voltage-dependence and gating, cell surface expression of the channel, and cell-cell and cell-matrix adhesion. Interestingly, *Scn1b* was found up-regulated in Me5 neurons from *Mecp2<sup>-Y</sup>* mice, a model of Rett syndrome, in comparison to wild types, and may be at least partly responsible for the hyperexcitability of the Me5 neurons in this model<sup>40</sup>. It is thus possible that *Scn1b* up-regulation in *Sod1<sup>G86R</sup>* CSMN may result in neuronal hyperexcitability and potentially contribute to the cortical hyperexcitability that characterizes symptomatic and presymptomatic ALS patients<sup>13</sup>. Further functional analyses are required to reveal the role of *Scn1b* and other early-deregulated genes in CSMN function and survival, while their validation on patient tissues will be necessary to confirm their relevance to the Human disease. With these current limitations in mind, the data have the potential to inform the development of targeted therapies based on the maintenance of a properly functional population of CSMN in ALS.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

All animal experiments were performed under the supervision of authorized investigators and approved by the local ethical committee of Strasbourg University (CREMEAS, agreements # 00766.01 and 1534–2015082617403748). Transgenic male mice with the G86R murine *Sod1* missense mutation<sup>21</sup> were obtained from the animal facility of the Faculty of Medicine, University of Strasbourg. Non-transgenic age-matched male littermates served as controls. Mice received water and regular rodent chow *ad libitum*. *Sod1*<sup>G86R</sup> animals were followed daily, and disease progression was rated according to a clinical scale going from score 4 to 0, as we previously described<sup>22</sup>. End stage animals were harvested between score 1 and 0<sup>22</sup>.

### Retrograde labelling of CSMN

Mice were deeply anaesthetized with intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (Imalgène 1000®, Merial, France; 100 mg/kg body weight) and xylazine (Rompun 2%®, Bayer, Germany; 13 mg/kg body weight) solution and placed on a heating pad. A precise laminectomy was performed in cervical (C3-C4) or lumbar (L1-L2) region of the spinal cord, depending on the experiment, and the animals were positioned below a nanojector (Nanoject II, Drummond Scientific, PA, USA) mounted on a stereotaxic micromanipulator. Using pulled glass capillaries, the dura was punctured, the capillary lowered to the dorsal funiculus and five pressure microinjections of 23 nl of Fluorogold (Fluorochrome, CO) or green fluorescent microbeads (Green Retrobeads, Lumafluor Inc., NC, USA), were performed on each side of the dorsal funiculus.

For cervical CSMN quantification, *Sod1*<sup>G86R</sup> mice and their wild type littermates were injected at 55, 70, 85 and 100 days of age. Five days after Fluorogold injection, or upon reaching end stage of the disease, the animals were deeply anaesthetized by an i.p. injection of ketamine/xylazine (100 mg/kg; 13 mg/kg) and subjected to electromyographic recordings of the tibialis anterior and the gastrocnemius muscles of both limbs. The animals were then transcardially perfused with cold 0.1M PBS, followed by cold 4% PFA in 0.1M PBS. The brain, spinal cord, tibialis anterior and gastrocnemius muscles were collected.

For lumbar CSMN quantification, *Sod1*<sup>G86R</sup> mice and their wild type littermates were injected at 55, 70, 85 and 100 days of age. Five days after Fluorogold injection, or upon reaching end stage of the disease, the animals were perfused and the brains were collected.

For FACS experiments, *Sod1*<sup>G86R</sup> mice and their wild type littermates were injected with microbeads at 25 days of age, and CSMN purification were performed at 30, 60, 90 and 105 days of age.

### CSMN quantification

Brains from Fluorogold injected animals were cut in 40 µm thick coronal sections on a Leica VT 1000S

vibratome (Leica Biosystems, Germany) and mounted on slides with DPX mounting solution (06522-100ML; Sigma-Aldrich, MO, USA). Sections were imaged under an AxioImager.M2 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a structured illumination system (ApoTome.2; Carl Zeiss), a highly sensitive black and white camera (Hamamatsu, Japan) and the ZEN 2 software (Carl Zeiss). For mice injected in the cervical portion of the spinal cord, all FG-positive neurons present on both hemispheres of eight equally spaced coronal sections, separated by 480  $\mu\text{m}$ , spanning from to relative to Bregma were counted. For mice injected in the lumbar portion of the spinal cord, all FG-positive neurons present on both hemispheres of three equally spaced coronal sections, separated by 480  $\mu\text{m}$ , spanning from to relative to Bregma were counted. CSMN quantification was performed using a plugin of ImageJ (1.48k; NIH, MD, USA) (Supplementary Fig. 2). In brief, the plugin creates first a reversed image and performs a noise reduction with the ‘Median filter’. A Gaussian blur filtered image is then created and subtracted from the non-blurred image. The result is handled by the ‘rolling ball radius Subtract Background’ algorithm. The edges of the cells are sharpened and enhanced by the ‘Unsharp Mask filter’. The user then sets the threshold that will be used for the determination of black and white pixels of the binarized image version. The image is then binarized with the ‘Make Binary function’ and subjected to several morphological operations to close and fill holes in cells (‘erode and dilate’), eliminate small objects and separate touching cells by ‘watershed segmentation’. If needed, the user can further separate touching cells (white line drawing between cells), complete the filling of the holes (black brush drawing) and define a ROI. Cells are then counted with the ‘Analyse particles’ function. The plugin automatically exports the results as a spreadsheet file and an image file.

### **In situ hybridization and Crym-positive neuron quantification**

cDNA clone for *Crystallin-mu* (*Crym*) is a kind gift from the Arlotta lab. Riboprobes were generated as previously described<sup>17</sup>. Nonradioactive *in situ* hybridization was performed on 40  $\mu\text{m}$  vibratome coronal brain sections 0.14 mm anterior to Bregma. Selected sections were mounted on Superfrost plus slides (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and processed using reported methods<sup>41</sup>. Bright field 10X tiles images were acquired with a Eclipse E800 (Nikon, Japan) microscope equipped with a Digital Sight DS-Ri1 camera (Nikon) and run by the Nis Elements 4.0 software (Nikon). *Crym*-positive neurons were manually counted, on both hemispheres, within layer V, from M2 medially to S1 laterally by two experimenters blinded to the age and the genotype.

### **Spinal motor neuron quantification**

The C1-C4 cervical, T1-T4 thoracic and L1-L4 lumbar levels of spinal cord were cut on a vibratome into coronal sections of 40  $\mu\text{m}$ . For each region, four nonadjacent sections spaced by 320  $\mu\text{m}$  were labelled by immunohistochemistry as previously described<sup>42</sup>, using a goat anti-choline acetyltransferase (ChAT) antibody (Merk Millipore, MA, USA) and a biotinylated donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch, PA, USA). Two images (one per ventral horn) per section were captured using an AxioImager.M2 microscope (Carl Zeiss) equipped with a high-resolution B/W camera (Hamamatsu)

and run by the ZEN 2 software (Carl Zeiss). Two types of counting were performed by experimenters blinded to the age, genotype and portion of the spinal cord: 1) total number of ChAT-positive neurons and 2) ChAT-positive neurons with an area  $\geq 400 \mu\text{m}^2$ . Cells bodies sizes were determined using ImageJ (NIH).

### **Electromyography**

Electromyography was performed as previously described (Rouaux et al., 2007), in both the tibialis anterior and the gastrocnemius muscles. Briefly, mice were anaesthetized with a solution of ketamine/xylazine (100 mg/kg; 13 mg/kg) and kept under a heating pad to maintain a physiological muscle temperature ( $\pm 31^\circ\text{C}$ ). A concentric needle electrode (Medtronic, MN, USA) was inserted into the muscle, and a monopolar needle electrode (Medtronic) was inserted into the tail of the mouse to ground the system. Electrical activity was monitored on muscles of both limbs for at least 2 min. Spontaneous activity was differentiated from voluntary activity by visual inspection. Only spontaneous activity with a peak-to-peak amplitude of at least 50  $\mu\text{V}$  was considered to be significant.

### **Neuromuscular junction staining and morphological analysis**

Tibialis anterior muscles were dissected into bundles and processed for immunofluorescence with a rabbit anti-synaptophysin antibody, a rabbit anti-neurofilament antibody (Eurogentec, Belgium) followed by Alexa-conjugated donkey anti-rabbit 488 (Jackson ImmunoResearch) and rhodamine-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (Sigma-Aldrich), as previously described (ref). Neuromuscular junctions (NMJs) analysis was performed by an independent age and genotype-blinded observer, directly under AxioImager.M2 microscope (Carl Zeiss) equipped with a high-resolution B/W camera (Hamamatsu) and run by the ZEN 2 software (Carl Zeiss). On average 500 NMJs per animals were examined. NMJs were considered as partially denervated when the presynaptic nerve terminal labelled with synaptophysin was partially observed from the postsynaptic region labelled with  $\alpha$ -bungarotoxin, and denervated when the presynaptic nerve terminal was totally absent. Representative NMJs were imaged using the same microscope setting.

### **CSMN and CPN purification**

Purification of CSMN and CPN were performed in parallel from same WT or *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. Mice were deeply anaesthetized with an i.p. injection of ketamine/xylazine (100 mg/kg; 13 mg/kg) before decapitation. The brains were placed into a stainless steel coronal brain matrix (Harvard Apparatus, MA, USA), and 1 mm sections were transferred under a fluorescence SMZ18 microscope (Nikon). The layer V containing labelled CSMN and the upper layer II/III above were microdissected from four coronal sections and collected in separate tubes filled with iced HABG (Hibernate A (BrainBits, UK), B27, Glutamax (Gibco; Thermo Fisher Scientific) and 0.1N NaOH). The microdissected tissues were enzymatically digested with 34 U/ml papain at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min. Cells were mechanically dissociated by gentle trituration in iced HABG, filtered through 70  $\mu\text{m}$  cell strainer (Falcon; Corning, NY, USA) and

## RESULTATS

subjected to density centrifugation through a three-density step gradient of Percoll (Sigma-Aldrich) as described<sup>43</sup>. Upon centrifugation, the cell pellets were resuspended in cold PBS and fixed with 70% ethanol for 30 min at 4°C. Fixed cells were centrifuged to eliminate ethanol and resuspended in 0.1M PBS complemented with RNase inhibitors (Promega, WI, USA). Microbeads-labelled CSMN were purified using the FACS AriaII (BD Biosciences, NJ, USA), based on their fluorescence, size and granularity. Unlabelled CPN were purified by FACS based on their size and granularity. Approximately 2,000 CSMN and exactly 2,000 CPN were obtained from each adult mouse brain and were used as individual biological replicates for RNA sequencing. Upon purification, neurons were centrifuged and frozen as cell pellets.

### RNA sequencing

Full-length cDNA were generated from frozen cell pellets using the SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit for Sequencing (Clontech, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. 11 cycles of cDNA amplification were performed using the Seq-Amp polymerase. 600 ng of pre-amplified cDNA were then used as input for Tn5 transposon tagmentation by the Nextera XT kit (Illumina, CA, USA) followed by 12 cycles of library amplification. Following purification using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, CA, USA), the size and concentration of the libraries were assessed on an Agilent 2100 Bioanalyzer. The libraries were then loaded in the flow cell at a concentration of 3 nM, clusters were generated by using the Cbot and sequenced on the Illumina HiSeq 4000 system as paired-end 2x50-base reads, following Illumina's instructions.

### RNA sequencing analyses

Comparisons between the *Sod1*<sup>G86R</sup> and WT CSMN, and the *Sod1*<sup>G86R</sup> and WT CPN samples were performed at each age using the method proposed by Love et al. (2014)<sup>44</sup> implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.6.3). Two models were adjusted for the CSMN and CPN respectively at each age. Independent filtering based on the mean of normalized counts was performed in order to filter out the genes that have no or little chance of showing significance evidence of differential expression. Genes with high Cook's distance were also filtered out. Resulting p-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg (1995)<sup>45</sup> method. Average of read counts normalized and divided by gene length for each condition and an estimation of the log2Fold-Change for each comparison was made. A threshold of  $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$  and adjusted p-value  $< 0.05$  was chosen to identify significantly differentially expressed genes between *Sod1*<sup>G86R</sup> and WT samples for each age and neuronal population. To create a heatmap, z-scores were calculated from the relative averages and the standard deviation of either CSMN or CPN gene expression levels. An unsupervised hierarchical clustering using uncentered Pearson correlation and average linkage was generated with Gene Cluster 3.0 and the dendrogram was created with Java Treeview 1.1.6r4.



### **Enrichment analyses**

Enrichment analyses of the over-representation of biological processes were carried out with the Gene Ontology Consortium website (Gene Ontology Consortium, *Genome Res.* 2001; 8:1425-33).

### **Immunofluorescence**

Immunofluorescence for SCN1B was carried on as previously described (Arlotta, 2005) on 60 day-old brain coronal sections (Bregma -1.70), using rabbit anti-SCN1B (Cell Signaling Technology, MA, USA) and Alexa 546 goat anti-rabbit antibodies (Invitrogen, CA, USA) together with DAPI (Sigma-Aldrich).

### **Statistical analyses**

Data are expressed as the means  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad, CA, USA). Multiple t-tests corrected for multiple comparisons using the Holm-Sidak method were used to analyse CSMN and SMN counting, occurrence of denervated NMJ and of positive EMG recordings.

## REFERENCES

1. Siddique, T. *et al.* Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1381–1384 (1991).
2. Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59–62 (1993).
3. Renton, A. E., Chiò, A. & Traynor, B. J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* **17**, 17–23 (2014).
4. Philips, T. & Rothstein, J. D. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **69**, 1–21 (2015).
5. Genç, B. & Özdinler, P. H. Moving forward in clinical trials for ALS: motor neurons lead the way please. *Drug Discov. Today* **19**, 441–449 (2014).
6. Eisen, A. *et al.* Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **0**, 1–8 (2017).
7. Thomsen, G. M. *et al.* Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J. Neurosci.* **34**, 15587–15600 (2014).
8. Ling, S. C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* **79**, 416–438 (2013).
9. Brettschneider, J. *et al.* Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **74**, 20–38 (2013).
10. Braak, H. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis—a model of corticofugal axonal spread. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 708–714 (2013).
11. Kassubek, J. *et al.* Diffusion tensor imaging analysis of sequential spreading of disease in amyotrophic lateral sclerosis confirms patterns of TDP-43 pathology. *Brain* **137**, 1733–1740 (2014).
12. Eisen, A., Kim, S. & Pant, B. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle and nerve* **15**, 219–224 (1992).
13. Vucic, S., Nicholson, G. A. & Kiernan, M. C. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **131**, 1540–1550 (2008).
14. Geevasinga, N. *et al.* Cortical excitability changes distinguish the motor neuron disease phenotypes from hereditary spastic paraplegia. *Eur. J. Neurol.* **22**, 826–831 (2015).
15. Zang, D. W. & Cheema, S. S. Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1 G93A G1H transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* **332**, 99–102 (2002).
16. Ozdinler, P. H. *et al.* Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G93A transgenic ALS mice. *J.*

- Neurosci.* **31**, 4166–4177 (2011).
17. Arlotta, P. *et al.* Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207–221 (2005).
  18. Kamiyama, T. *et al.* Corticospinal tract development and spinal cord innervation differ between cervical and lumbar targets. *J. Neurosci.* **35**, 1181–1191 (2015).
  19. Olivares-Moreno, R. *et al.* The rat corticospinal system is functionally and anatomically segregated. *Brain Struct. Funct.* 1–14 (2017).
  20. Schieber, M. H. Chapter 2 comparative anatomy and physiology of the corticospinal system. *Handb. Clin. Neurol.* **82**, 15–37 (2007).
  21. Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H. & Gordon, J. W. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 689–693 (1995).
  22. 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.* **27**, 5535–5545 (2007).
  23. Fischer, L. R. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* **185**, 232–240 (2004).
  24. Fame, R. M., MacDonald, J. L. & Macklis, J. D. Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. *Trends Neurosci.* **34**, 41–50 (2011).
  25. Ye, Z. *et al.* Instructing perisomatic inhibition by direct lineage reprogramming of neocortical projection neurons. *Neuron* **88**, 475–483 (2015).
  26. Leyton, A. S. F. & Sherrington, C. S. Observations on the excitable cortex of the chimpanzee, orang-utan, and gorilla. *Exp. Physiol.* **11**, 135–222 (1917).
  27. Penfield, W. & Boldrey, E. Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain* **60**, 389–443 (1937).
  28. Grunbaum, A. S. F. & Sherrington, C. S. Observations on the physiology of the cerebral cortex of some of the higher apes. *Proc. R. Soc. London* **69**, 206–209 (1901).
  29. Akintunde, A. & Buxton, D. F. Origins and collateralization of corticospinal, corticopontine, corticorubral and corticostriatal tracts: a multiple retrograde fluorescent tracing study. *Brain Res.* **586**, 208–218 (1992).
  30. Millecamps, S. *et al.* SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype–phenotype correlations. *J. Med. Genet.* **47**, 554–560 (2010).
  31. Mochizuki, Y., Mizutani, T. & Takasu, T. Amyotrophic lateral sclerosis with marked neurological asymmetry: clinicopathological study. *Acta Neuropathol.* **90**, 44–50 (1995).
  32. Ravits, J. M. & La Spada, A. R. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology* **73**, 805–811 (2009).
  33. Zhang, Y. *et al.* An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and

- vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* **34**, 11929–11947 (2014).
34. Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M. & Shaw, P. J. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 616–630 (2011).
  35. Heath, P. R., Kirby, J. & Shaw, P. J. Investigating cell death mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis using transcriptomics. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–10 (2013).
  36. Caballero-Hernandez, D. *et al.* The ‘Omics’ of amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Mol. Med.* **22**, 53–67 (2016).
  37. Molyneaux, B. J. *et al.* DeCoN: Genome-wide analysis of in vivo transcriptional dynamics during pyramidal neuron fate selection in neocortex. *Neuron* **85**, 275–288 (2015).
  38. Jiang, Y.-M. *et al.* Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **57**, 236–251 (2005).
  39. Patino, G. a *et al.* A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *J. Neurosci.* **29**, 10764–10778 (2009).
  40. Oginsky, M. F., Cui, N., Zhong, W., Johnson, C. M. & Jiang, C. Hyperexcitability of mesencephalic trigeminal neurons and reorganization of ion channel expression in a Rett syndrome model. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1151–1164 (2017).
  41. Berger, U. V. & Hediger, M. A. Differential distribution of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in tanycytes of the third ventricle. *J. Comp. Neurol.* **433**, 101–114 (2001).
  42. Scekic-Zahirovic, J. *et al.* Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J.* **35**, 1077–1097 (2016).
  43. Guez-Barber, D. *et al.* FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain. *J. Neurosci. Methods* **203**, 10–18 (2012).
  44. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
  45. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**, 289–300 (1995).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The work has been supported by an ERC starting grant #639737, a Marie Curie career integration grant #618764, an AFM-Telethon trampoline grant #16923 and a Neurex grant to CR, and an Inserm/Région Alsace PhD fellowship to CM.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1: CSMN progressively degenerate in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice.

**a.** Schematic of the experimental design. **b.** Representative negative fluorescence images of brain coronal sections (Bregma 0.74 mm) showing Fluorogold-labelled CSMN in the cerebral cortex of wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice of 60, 75, 90 and 105 days of age (wild type) or end stage (*Sod1<sup>G86R</sup>*). Red shapes indicate the positions where close-ups were acquired. **c.** Close-ups showing the progressive loss of labelled CSMN over time in the cerebral cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (lower panels) compared to their wild type littermates (upper panels). **d.** Bar graph representing the average number of CSMN present on eight equally spaced coronal sections along the rostro-caudal axis and representing the progressive loss of CSMN over time in the brains of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) compared to their wild type littermates (grey). \*\*\*  $p < 0.001$ . Scale bars: 200  $\mu\text{m}$  in **b.** and 50  $\mu\text{m}$  in **c.**

### Figure 2: In *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, CSMN degeneration starts caudally and progresses rostrally

Graphs representing the average number of Fluorogold-labelled CSMN counted on both hemispheres of equally spaced coronal sections 2 (Bregma 2.10 mm) to 9 (Bregma -1.70 mm) of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) and their wild type littermates (grey) at 60, 75, 90 and 105 days of age (wild type) or end stage (*Sod1<sup>G86R</sup>*). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### Figure 3: Lumbar-projecting CSMN degenerate before lumbar SMN

**a.** Schematic of the experimental design. **b.** Bars graph representing the average number of CSMN present on three equally spaced caudal coronal sections and representing the early and progressive loss of lumbar-projecting CSMN over time in the brains of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) compared to their wild type littermates (grey). **c.** Representative negative fluorescence images of brain coronal sections (Bregma -1.06 mm) showing the decreased number of Fluorogold-labelled CSMN in the cerebral cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 60 days of age and at end stage, compared to their wild type littermates. **d.** Representative images of coronal sections of the spinal cord of wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 60 days of age and at 105 days / end stage showing ChAT-positive neurons present in the ventral part of the spinal cord. Arrows indicate large ChAT-positive neurons, arrowheads indicate smaller or shrank ChAT-positive neurons. **e.** Bar graph representing the average number of ChAT-positive neurons counted in the ventral part of lumbar spinal cord sections of wild type (grey) and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) at 60, 75, 90 and 105 days of age / end stage. **f.** Bar graph representing the average number of large ChAT-positive neurons, with an area  $\geq 400 \mu\text{m}^2$ , counted in the ventral part of lumbar spinal cord sections of wild type (grey) and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) at 60, 75, 90 and 105 days of age / end stage. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  in **c.** and 50  $\mu\text{m}$  in **d.**

### Figure 4: RNAseq analysis on purified CSMN and CPN from adult wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice

**a.** Schematic representation of the experimental design. **b.** Schematic representation of ages of CSMN labelling and CSMN and CPN harvesting. **c.** Venn diagrams showing the relative numbers of deregulated genes between the two neuronal populations at each age analysed. **d.** Gene ontology analysis of enriched biological processes at symptomatic ages. #, number of genes in the category; FE, fold enrichment.

### Figure 5: Analysis of CSMN-specific up- and down-regulated genes across ages

**a.** Venn diagrams showing the numbers of CSMN-specific up- (orange, left panel) and down-regulated genes (blue, right panel) at each four ages analysed. **b.** Heatmaps representing the hierarchical clustering of CSMN-specific up- (left) and down-regulated genes (right). Each column represents a condition, each line a gene. The heatmap colors indicate the z-score of gene expression level. The Z-scores were calculated from the relative averages and the standard deviation of either CSMN or CPN gene expression levels. Orange corresponds to high expressions, blue to low expressions.

### Figure 6: Profiles of the expression of CSMN-specific up- and down-regulated genes

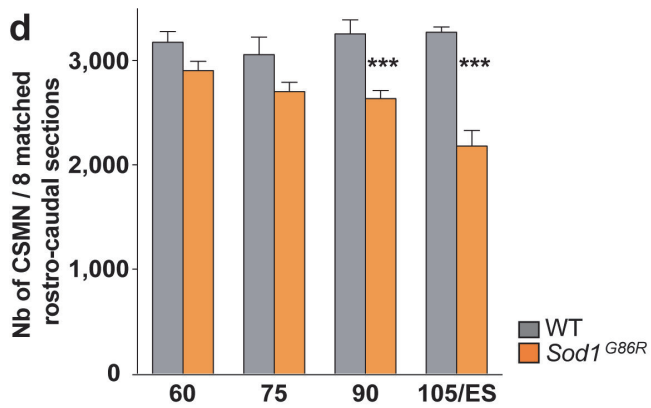
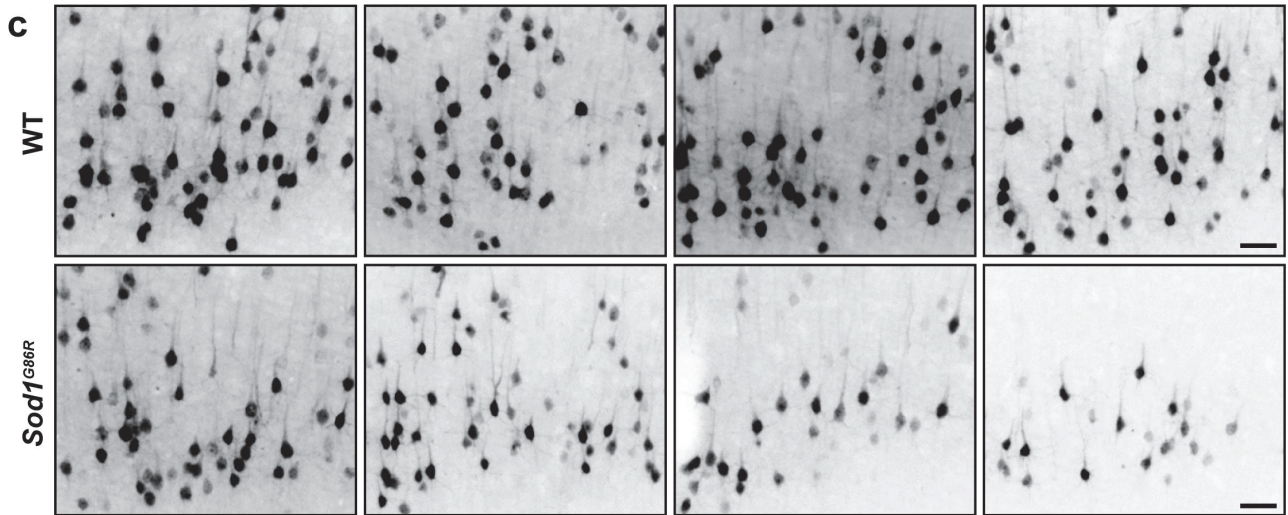
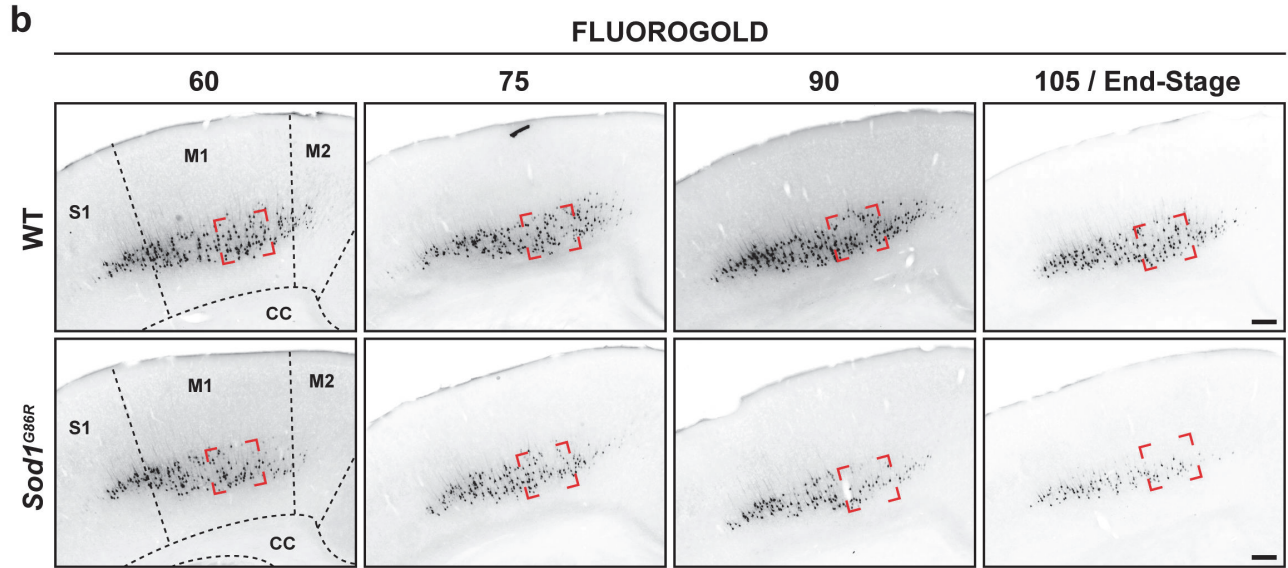
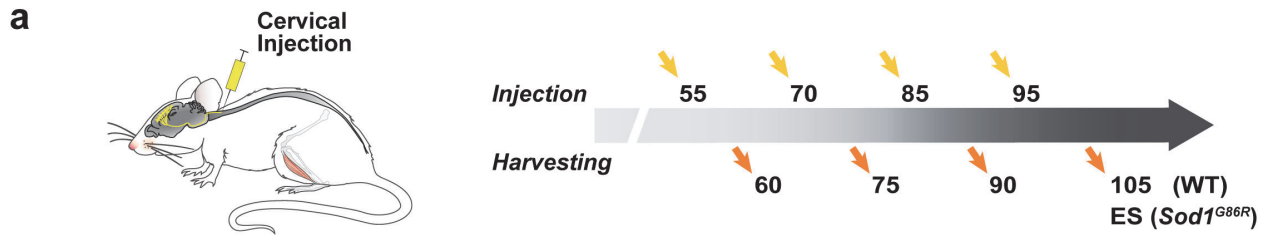
Graphs representing relative gene expressions across sample types and over time. **a.** CSMN-specific up-regulate genes with a stable expression. **b.** CSMN-specific up-regulate genes with increased expression over time. **c.** CSMN-specific up-regulate genes with decreased expression over time. **d.** CSMN-specific down-regulated genes.

### Figure 7: Validation of *Scn1b* presymptomatic up-regulation in *Sod1<sup>G86R</sup>* CSMN

**a.** Graph representing *Scn1b* relative expression across sample types and over time. **b.** Representative fluorescence images of brain coronal sections (Bregma -1.70 mm) showing SCN1B expression (yellow) and DAPI staining (blue) in the cerebral cortex of 60 day-old wild type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. Arrows point to healthy nuclei, arrowheads to pyknotic nuclei. Scale bars: 200  $\mu\text{m}$  and 50  $\mu\text{m}$  in close-ups.

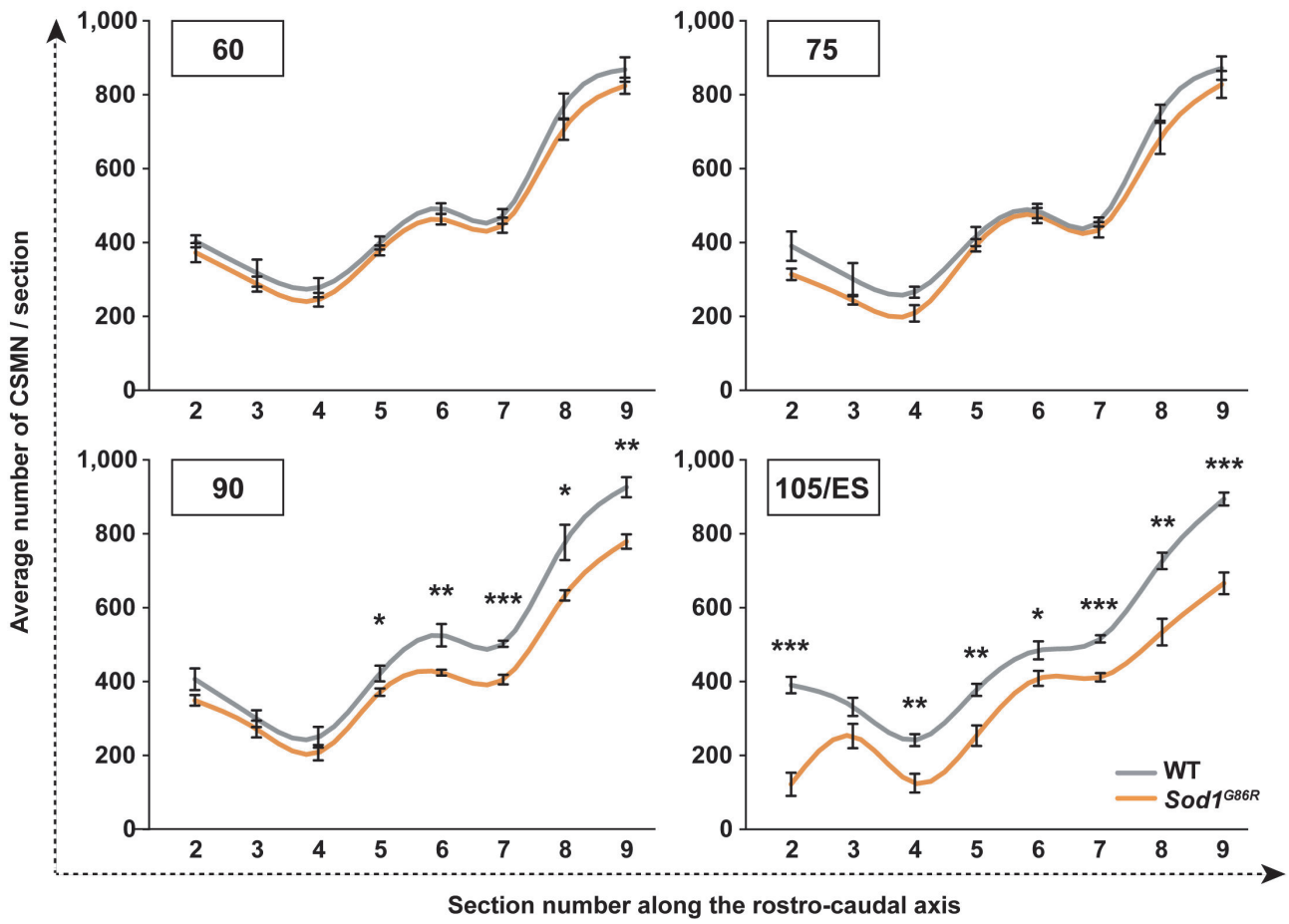
RESULTATS

Marques *et al.*, Figure 1



RESULTATS

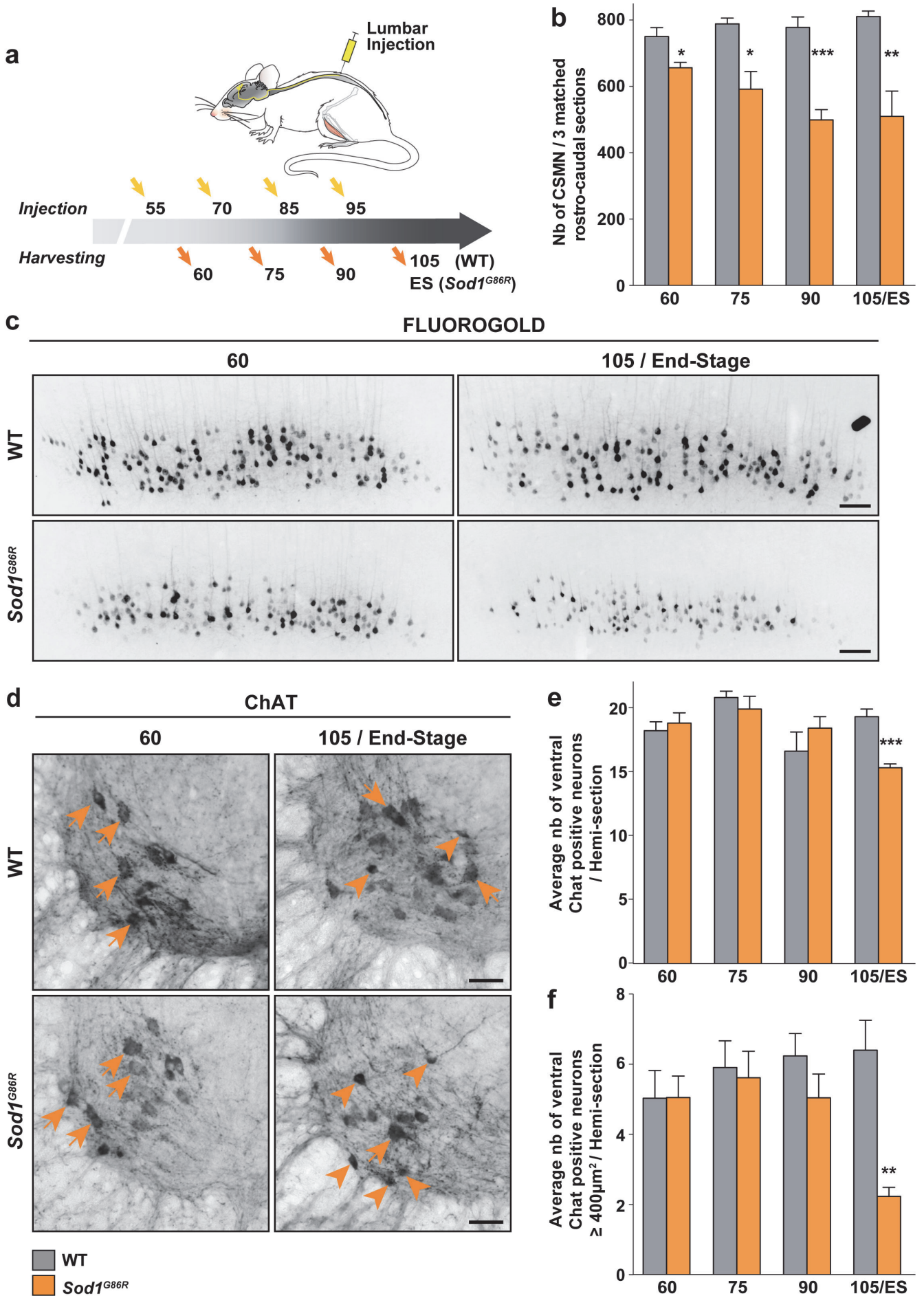
Marques *et al.*, Figure 2



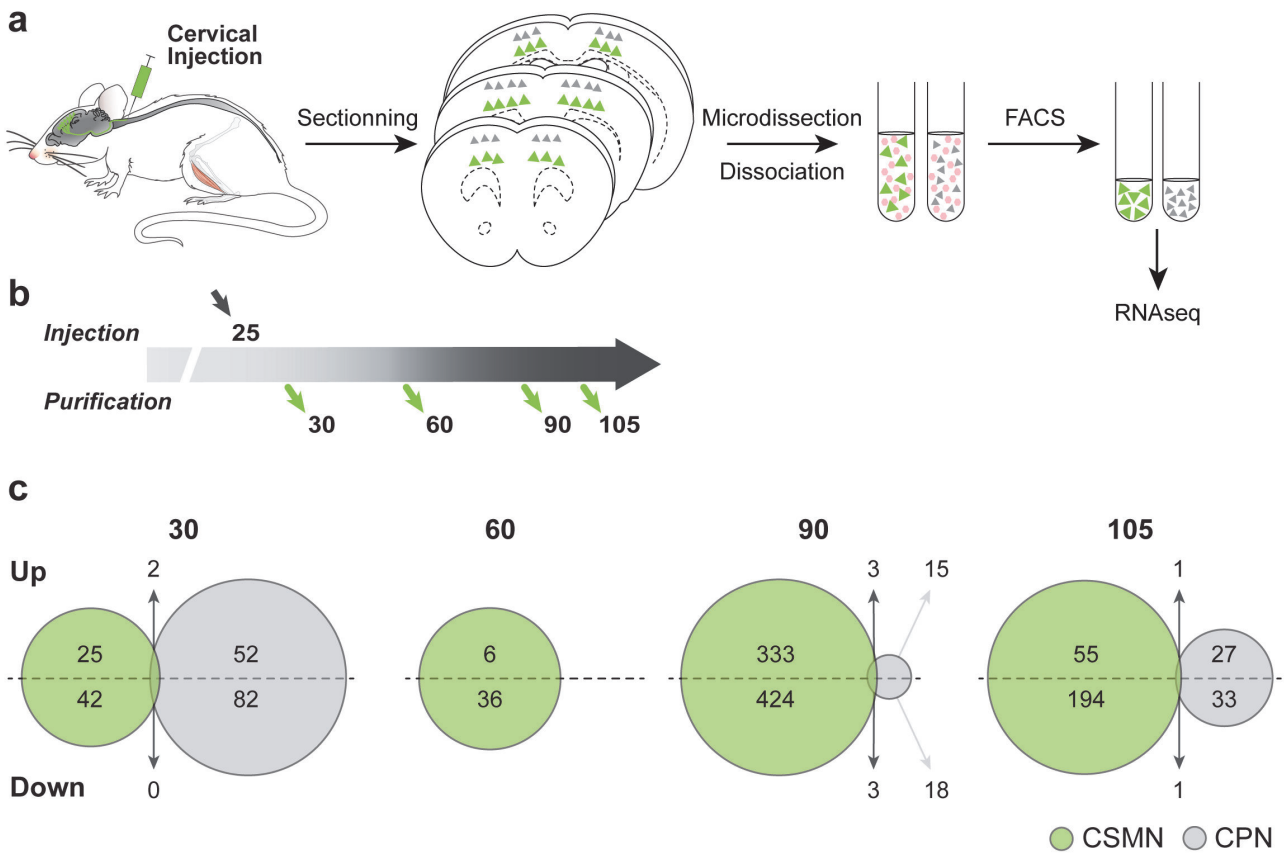


RESULTATS

Marques *et al.*, Figure 3

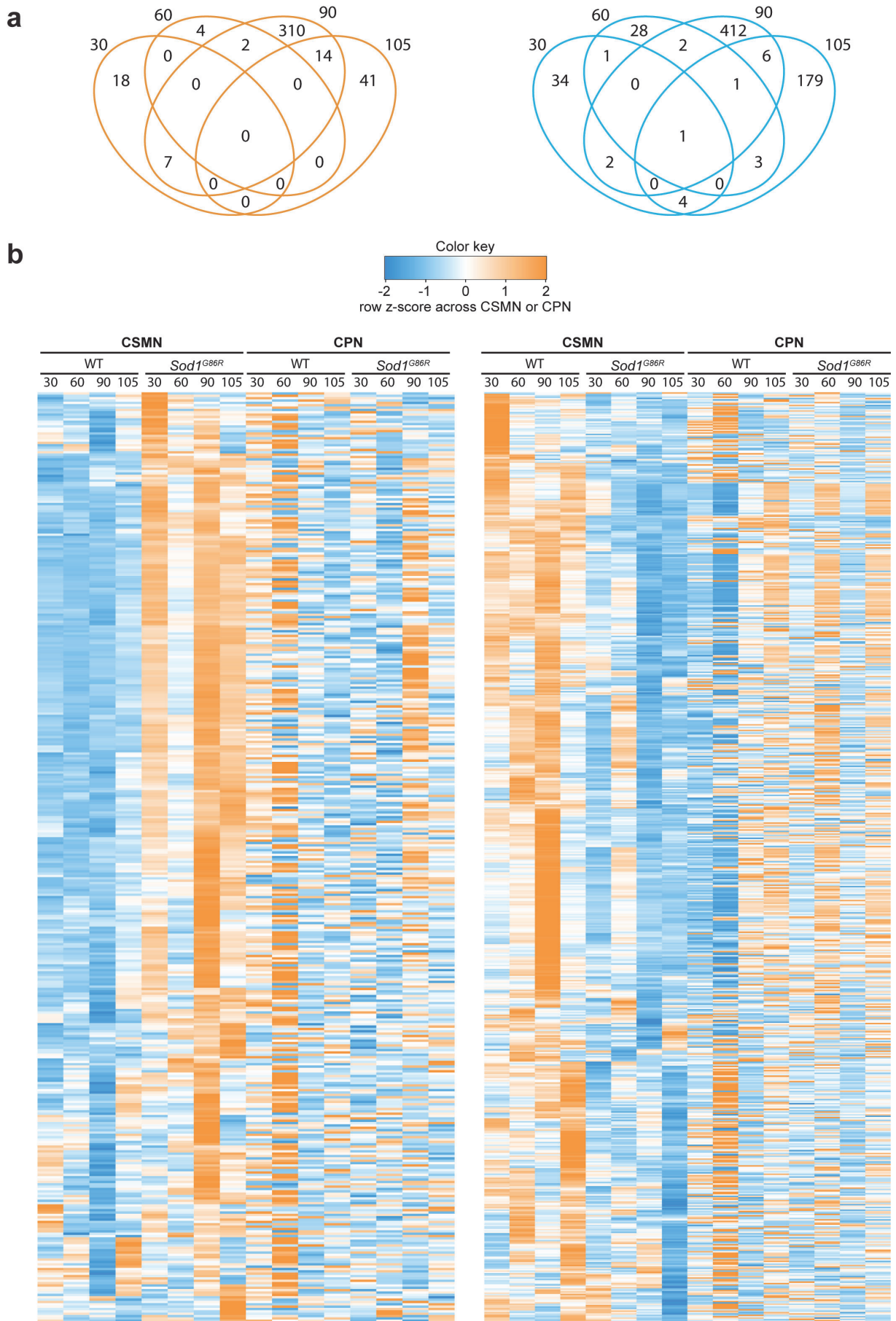


Marques *et al.*, Figure 4



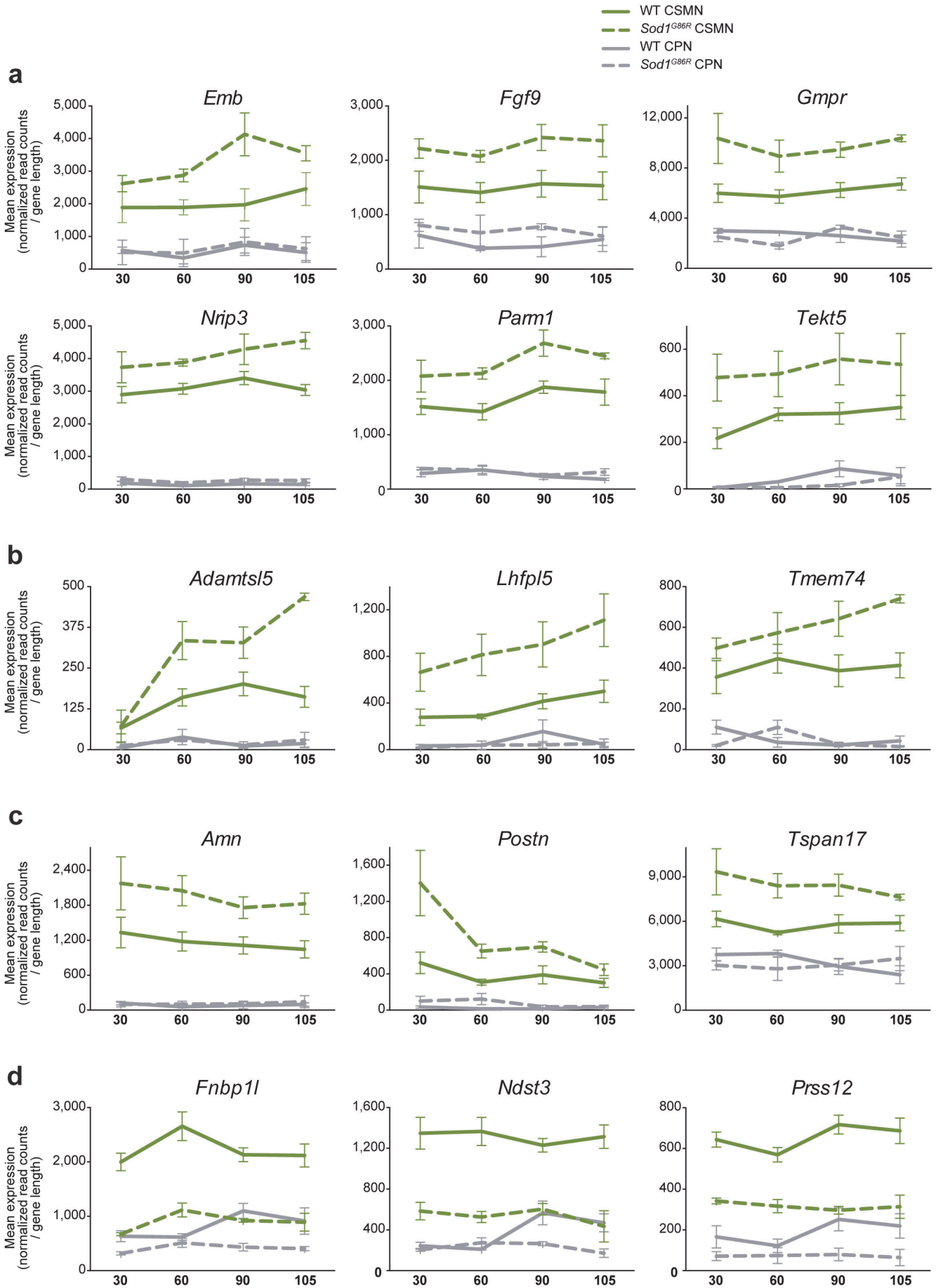
RESULTATS

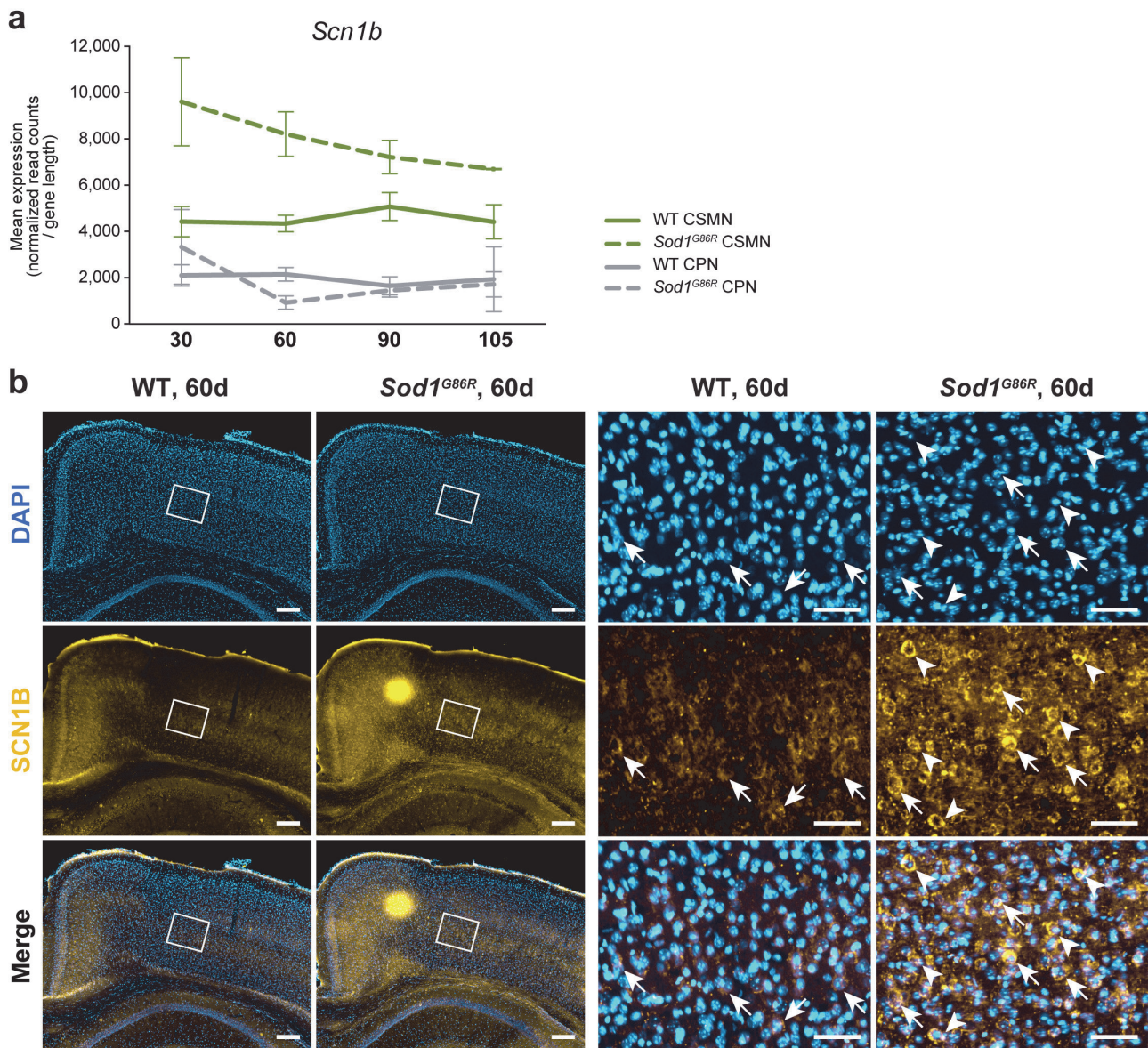
Marques *et al.*, Figure 5



RESULTATS

Marques *et al.*, Figure 6





## SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

### Supplementary Figure 1: Retrograde labelling of CSMN as a result of Fluorogold injections in the cervical portion of the spinal cord

Representative negative fluorescence images of brain coronal sections numbered 1 (Bregma 2.58 mm) to 10 (Bregma -2.30 mm) showing Fluorogold-labelled CSMN in the cerebral cortex of a 90 day-old wild type mouse. Upon Fluorogold injection into the cervical portion of the dorsal funiculus, labelled CSMN were consistently observed from section 2 (Bregma 2.10 mm) to 9 (Bregma -1.70 mm). Scale bar: 1 mm.

### Supplementary Figure 2: ImageJ plugin developed to quantify the number of CSMN on thick vibratome sections

**a.** Opening of the original image. **b.** Application of the ‘Invert’ function and of the ‘Median’ filter. **c.** Creation and subtraction of a Gaussian blur filtered image from the non-blurred image, followed by the application of the ‘Subtract Background’ algorithm. **d.** Sharpening and edge enhancement with the ‘Unsharp Mask’ filter. **e.** Manual Threshold adjustment for the creation of a black and white image. **f.** Image binarization with the ‘Make Binary’ function followed by successive ‘erode and dilate’ operations to close and fill holes in cells, and watershed segmentation of touching cells. **g.** Additional manual watershed and holes filling if needed, and ROI drawing. **h.** Cell counting within the ROI, with the Analyse particles function.

### Supplementary Figure 3: The population of *Crym*-positive neurons progressively disappears from the layer V of the motor cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice

**a.** Representative images of *in situ* hybridization on brain coronal sections (Bregma 0.14 mm) of end stage *Sod1<sup>G86R</sup>* and 115 day-old wild type control mice showing decreased *Crym* expression in the layer V of the cerebral cortex. Dotted red rectangles indicate the areas where *Crym*-positive neurons were counted. **b.** Close-ups of the M1 area. **c.** Bar graph representing the percentage of *Crym*-positive neurons in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) relative to their wild type littermates (grey). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Scale Bar = 200  $\mu\text{m}$  in a. and 100  $\mu\text{m}$  in b.

### Supplementary Figure 4: Retrograde labelling of CSMN as a result of Fluorogold injections in the lumbar portion of the spinal cord

Representative negative fluorescence images of brain coronal sections numbered 1 (Bregma 2.58 mm) to 10 (Bregma -2.30 mm) showing Fluorogold-labelled CSMN in the cerebral cortex of a 90 day-old wild type mouse. Upon Fluorogold injection into the lumbar portion of the dorsal funiculus, labelled CSMN were consistently observed from section 7 (Bregma -0.46 mm) to 9 (Bregma -1.70 mm). Scale bar: 1 mm.

### Supplementary Figure 5: In *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, NMJ denervation starts at P90

**a.** Bar graph representing the proportion of animals presenting or not (grey) some denervation (orange) during electromyography (EMG) recording. **b.** Representative images of innervated and denervated muscles assessed by EMG. **c.** Bar graph representing average proportions of innervated (grey), partly denervated (orange) or fully denervated (red) neuromuscular junctions (NMJ) upon staining and microscopic analysis of one tibialis anterior muscle of wild type *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 60, 75, 90 and 105 days of age or end stage (ES). **d.** Representative maximum intensity projection images of z-stacks of typical innervated, partly or fully denervated NMJ from 90 day-old *Sod1<sup>G86R</sup>* and wild type mice. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Scale Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

### Supplementary Figure 6: Adult CSMN and CPN purification by FACS

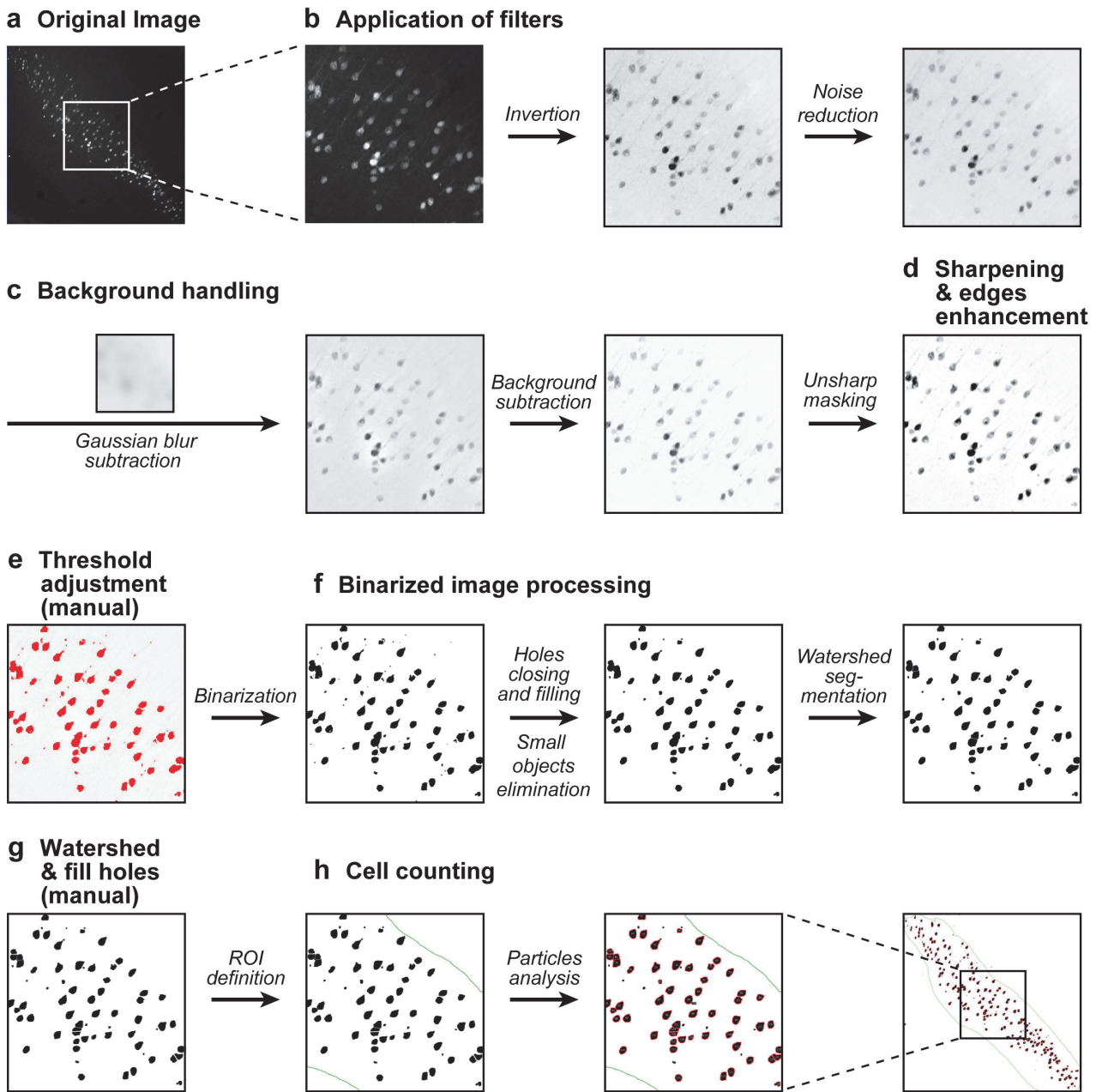
**a.** Representative image of a brain coronal section showing green fluorescent microbeads-labelled CSMN within layer V of the motor and somatosensory areas, and representing the two microdissected areas (left), along with representative FACS plots (right) of CPN (top) and CSMN (bottom) purifications. **b.** RNAseq gene expression profiles of typical cortical layer V subcerebral projection neuron markers showing their enrichment in purified CSMN versus CPN at all ages and for both genotypes. **c.** RNAseq gene expression profiles of typical cortical layer II/III callosal projection neuron markers showing their enrichment in purified CPN versus CSMN at all ages and for both genotypes.

FLUOROGOLD - Retrograde Labelling from the Cervical Spinal Cord

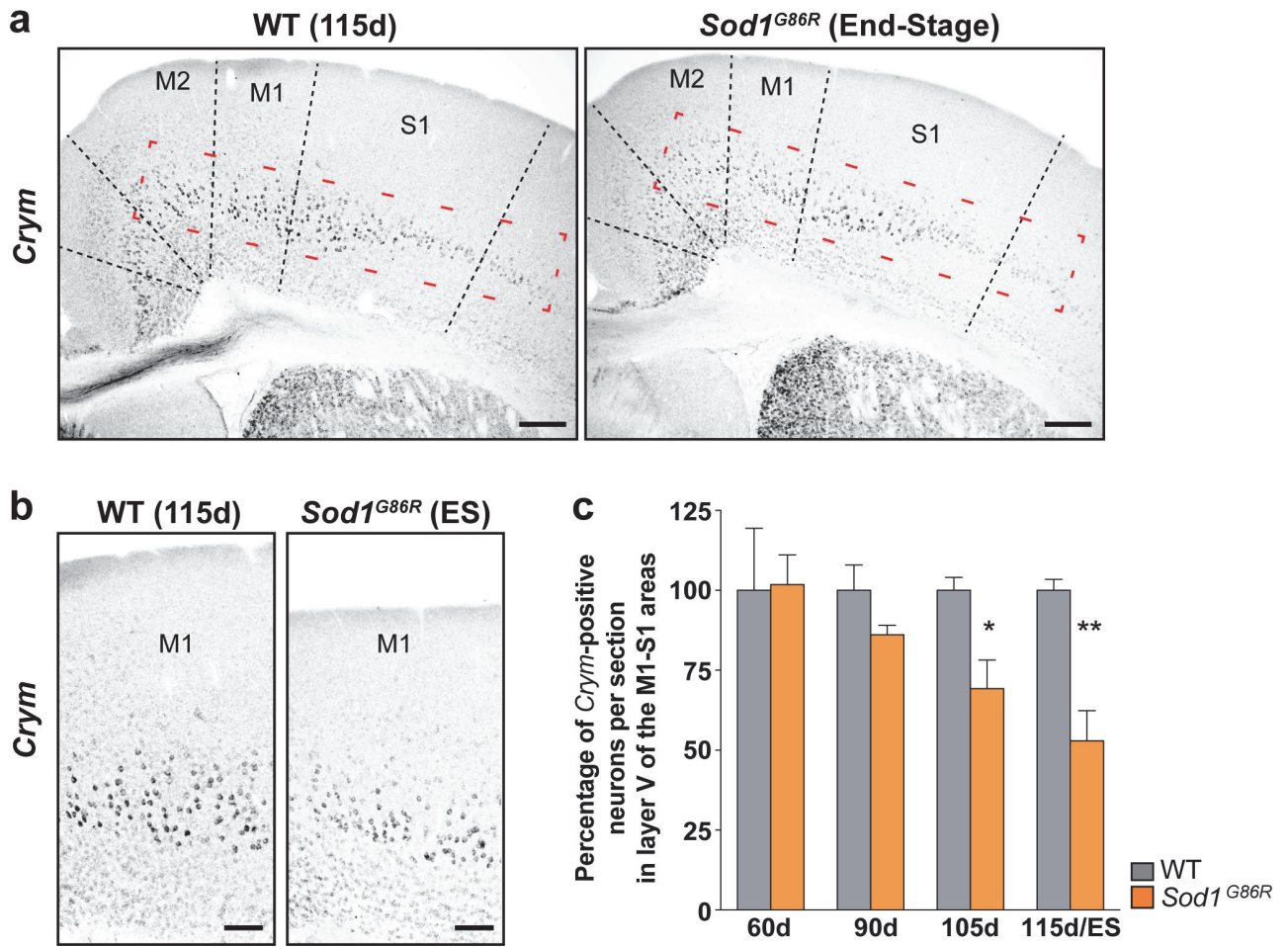
---

Position relative to Bregma (mm)





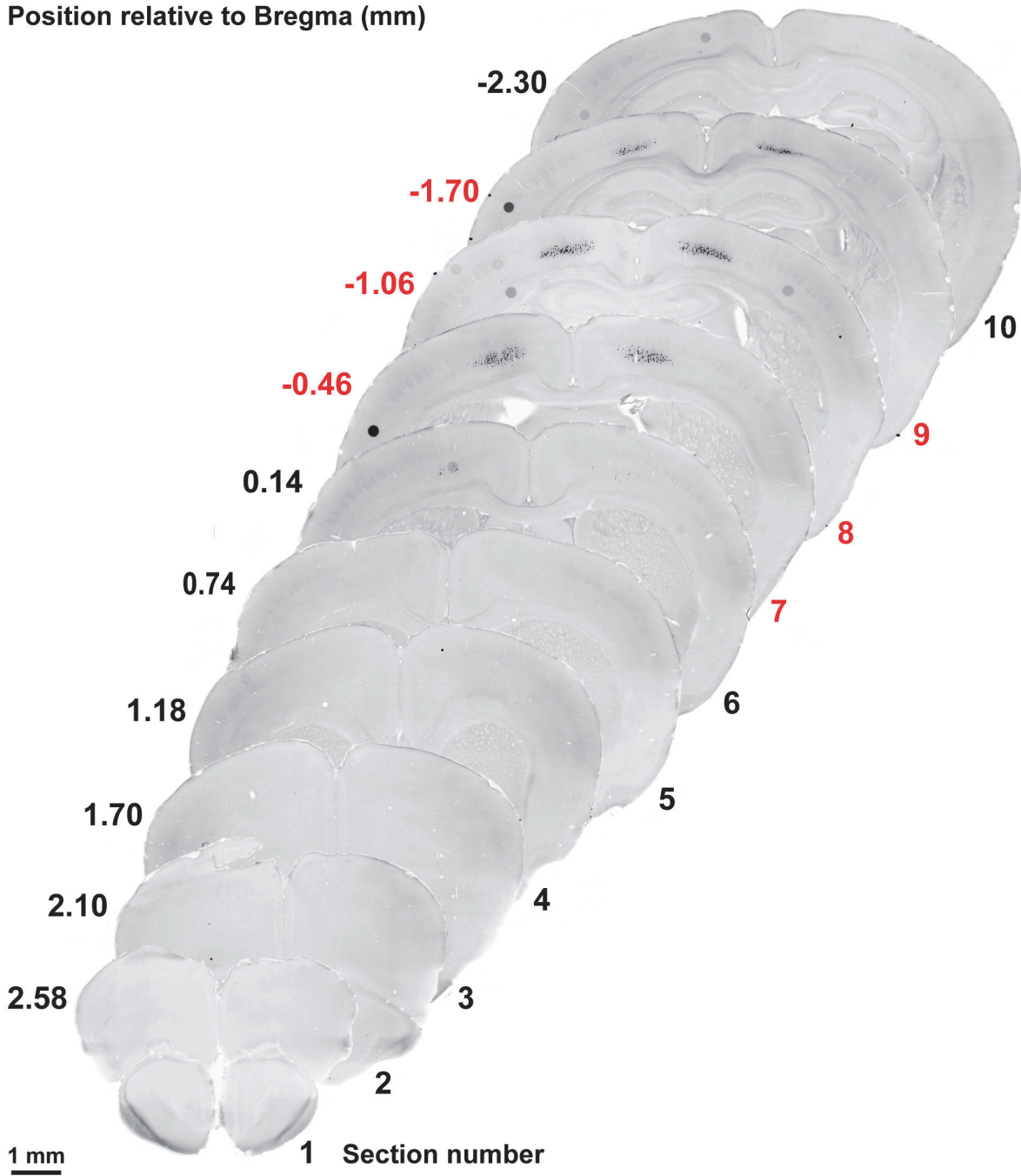




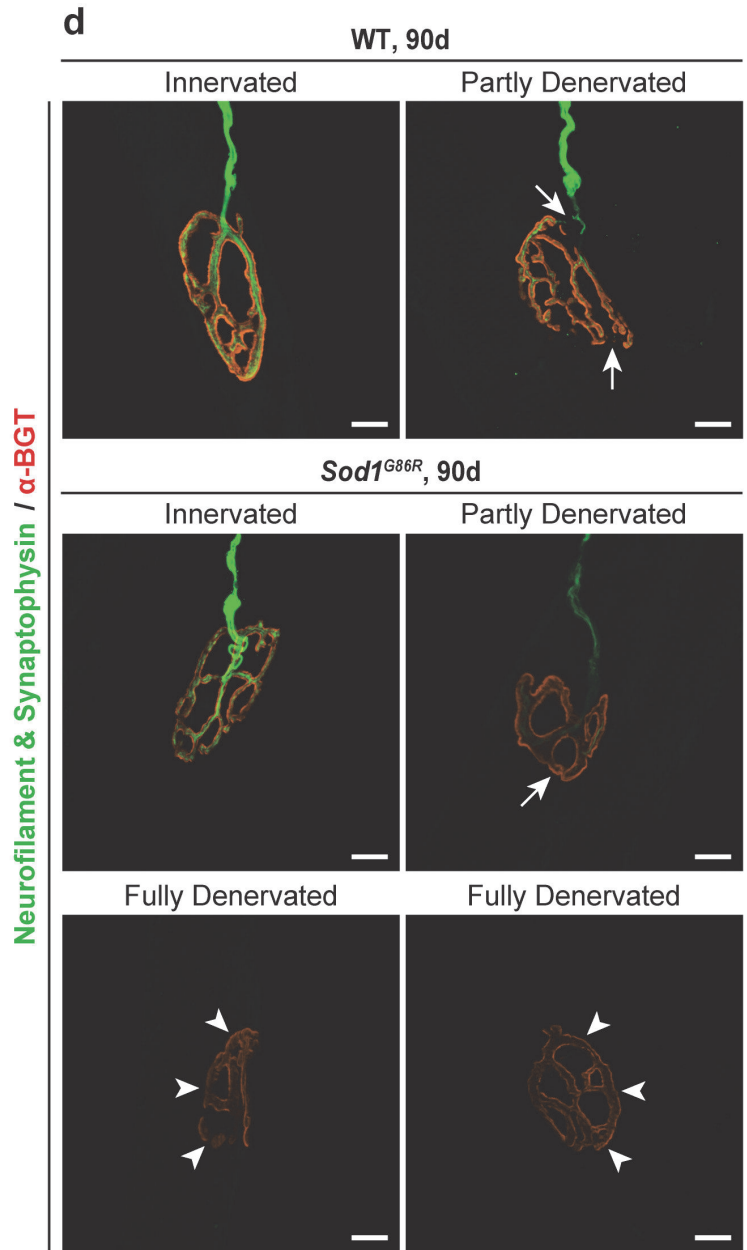
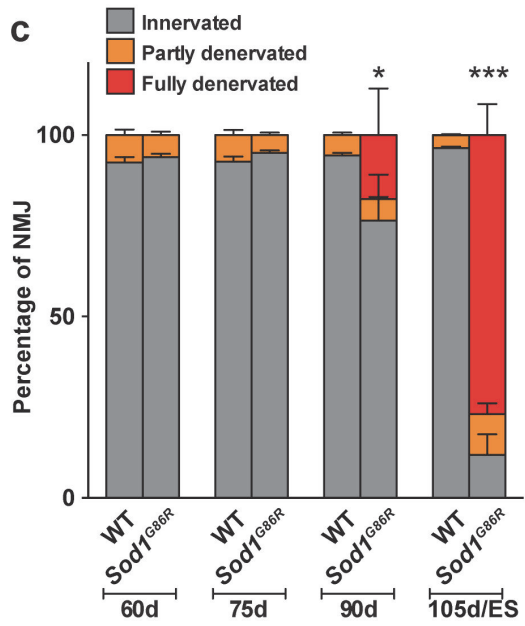
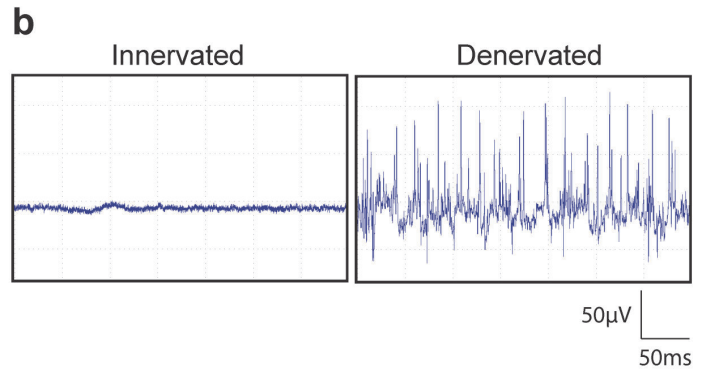
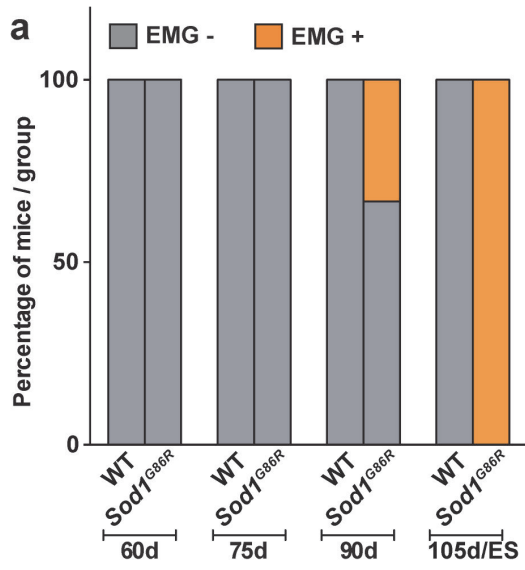
FLUOROGOLD - Retrograde Labelling from the Lumbar Spinal Cord

---

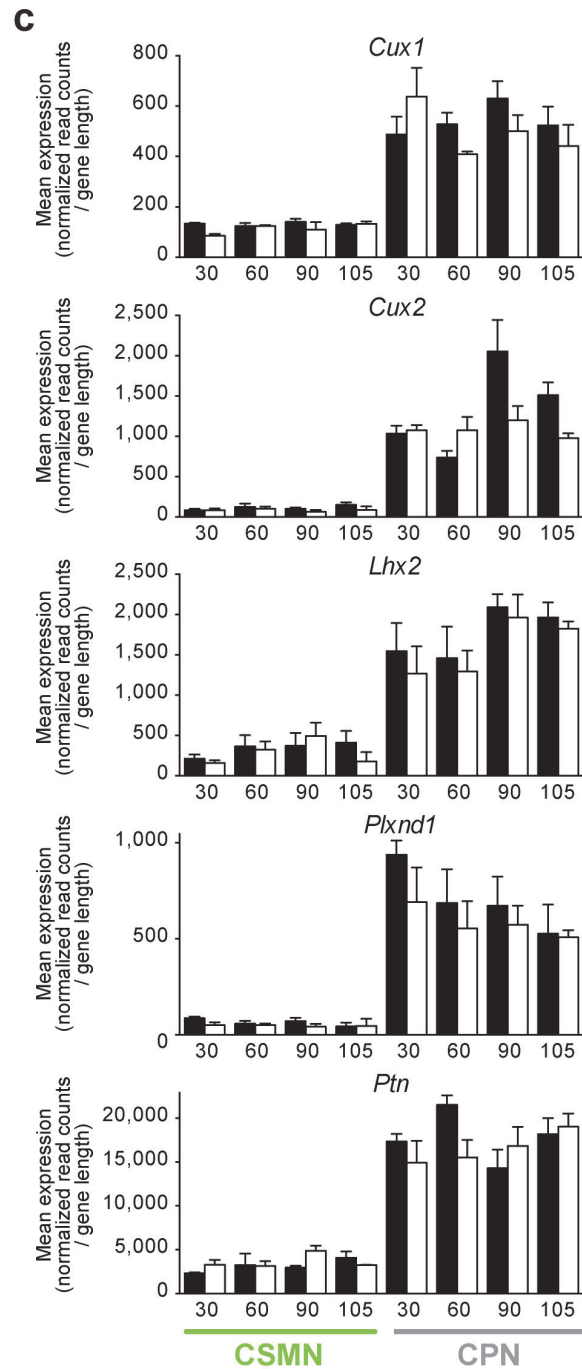
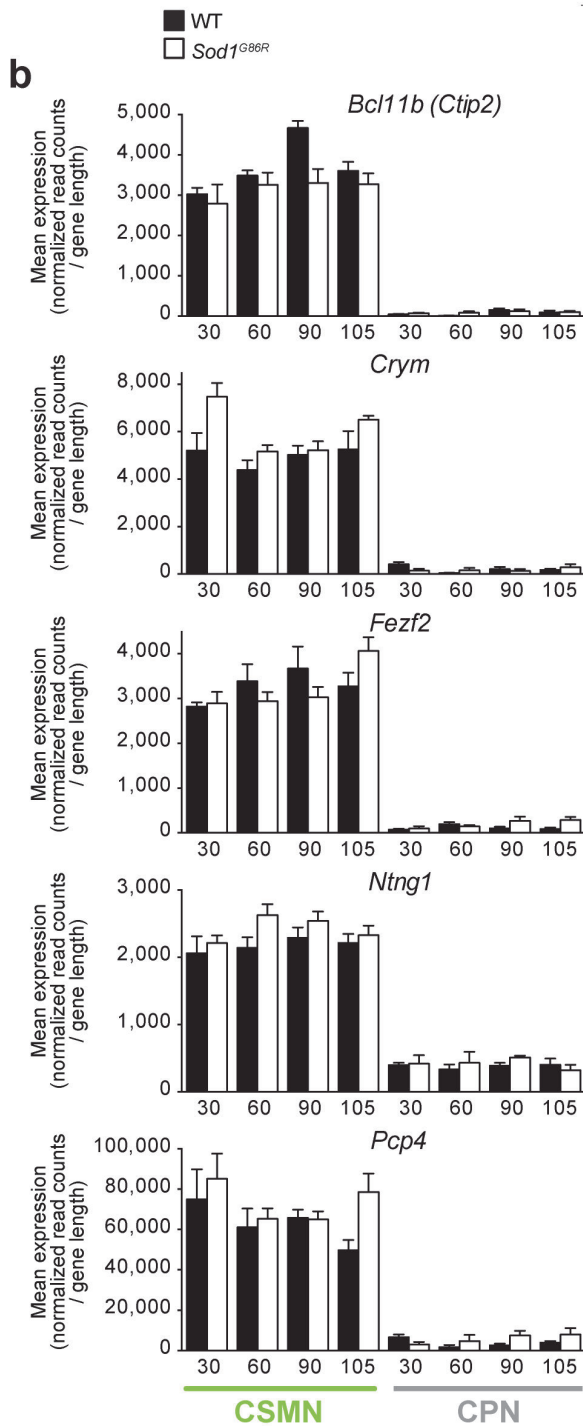
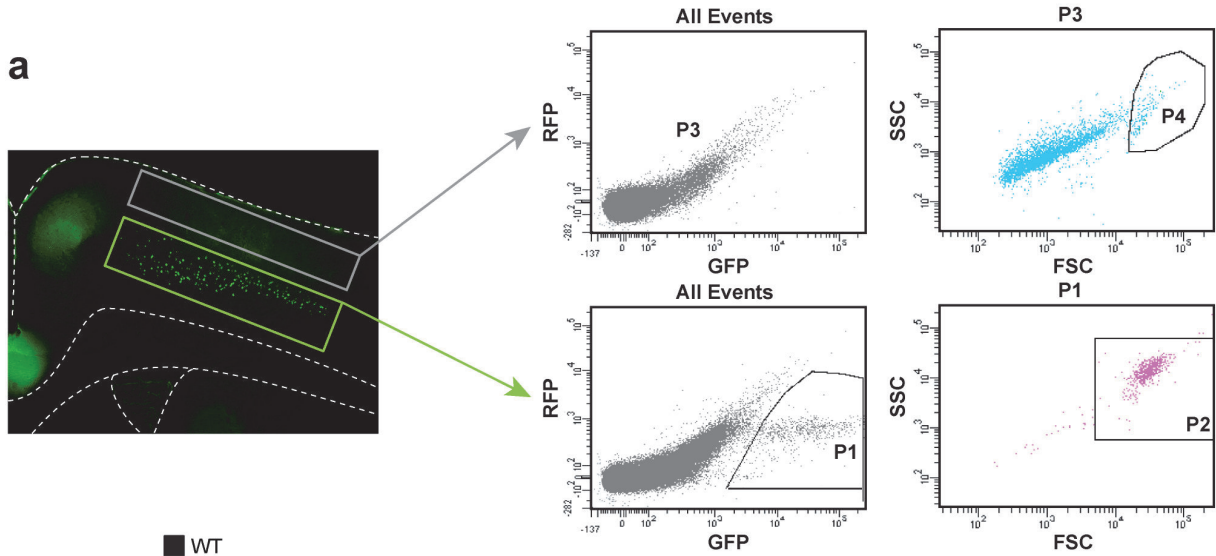
Position relative to Bregma (mm)



Marques *et al.*, Supplementary Figure 5



Marques *et al.*, Supplementary Figure 6



## 2. Développement d'une approche expérimentale permettant la purification de populations de neurones corticaux à partir de cerveaux individuels de souris adultes

*(Publication 2, en préparation)*

Pour comprendre le rôle spécifique des différents types cellulaires et leur implication physiologique ou dans certaines pathologies où leur atteinte est observée, il est nécessaire de les identifier et de les isoler spécifiquement de la densité et de l'hétérogénéité cellulaire du cortex cérébral. Une avancée majeure à cet égard est venue du développement de nouvelles techniques permettant de marquer précisément des types cellulaires spécifiques de manière fluorescente, grâce à la génétique (Feng et al., 2000; Kuhlman & Huang, 2008; Lobo et al., 2006; Madisen et al., 2010; Miyoshi & Fishell, 2006) ou bien à l'aide de traceurs fluorescents rétrogrades (Katz & Iarovici, 1990). Ces techniques rendent possible l'isolement de cellules spécifiques fluorescentes de leurs voisines non marquées par des procédures de tri cellulaire, telles que la cytométrie de flux ou FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). Elles se révèlent être extrêmement utiles pour des études *in vitro* (Catapano et al., 2001; Junger & Junger, 1998) ou pour des analyses moléculaires (Arlotta et al., 2005; Molyneaux et al., 2005, 2009; Özdinler & Macklis, 2006) par exemple.

Ces nouvelles méthodes associées au développement d'outils de séquençage ont été essentiellement utilisées dans les études du développement cortical où elles ont permis d'approfondir les connaissances des mécanismes moléculaires qui contrôlent le développement de populations neuronales immatures ou postnatales précises du cortex cérébral (Arlotta et al., 2005; Catapano et al., 2001; Junger & Junger, 1998; Lodato et al., 2014; Molyneaux et al., 2005, 2009; Özdinler & Macklis, 2006). Cependant, l'étude des processus moléculaires impliqués dans le maintien d'une population saine de neurones corticaux adultes ou dans sa mort dans le cas de maladie neurodégénérative n'a, jusqu'à présent, jamais été réalisée. Cela peut s'expliquer en partie par les propriétés intrinsèques de ces populations qui les rendent plus fragiles et plus difficiles à isoler.

Il semblait donc particulièrement important de développer un protocole expérimental permettant d'isoler ces neurones corticaux adultes spécifiques afin d'analyser leur profil d'expression génique et mettre en évidence des mécanismes moléculaires responsables de leur dégénérescence afin de mieux comprendre leur implication dans ces pathologies, tel que l'atteinte des NMCS dans la SLA (Marques et al., en cours de rédaction). Ainsi, notre étude, décrite en partie 1 des résultats, n'a été rendue possible que par le développement récent d'une approche

expérimentale permettant de purifier ces neurones à partir du cortex cérébral de souris sauvages ou *Sod1<sup>G86R</sup>* en vue d'une analyse transcriptionnelle par séquençage de l'ARN (RNA-seq).

En absence de lignée de souris transgéniques permettant le marquage génétique des NMCS, j'ai mis en place un protocole chirurgical permettant le marquage rétrograde des NMCS de souris à l'âge de 25 jours. Cet acte chirurgical consiste en l'injection stéréotaxique de microbilles fluorescentes vertes dans la région cervicale du funicule dorsal de la moelle épinière qui est l'axe de passage du TCS. Ces microbilles captées par les axones des NMCS sont transportées de manière rétrograde vers leur soma où elles résident de manière stable, sans induire de toxicité (Katz & Iarovici, 1990). La purification par FACS des NMCS adultes marqués a été réalisée en adaptant un ensemble de protocoles initialement développés pour la purification de populations de neurones excitateurs corticaux embryonnaires ou postnataux (Arlotta et al., 2005; Brewer & Torricelli, 2007; Guez-Barber et al., 2012). L'optimisation de ce protocole nous permet aujourd'hui de purifier environ 2 000 NMCS par FACS à partir d'un seul cerveau de souris adulte. Chaque cerveau représente ainsi un échantillon biologique. Par conséquent, ce protocole représente un atout considérable puisqu'il permet d'avoir accès à une représentation réelle du profil d'expression génique de la population de NMCS par rapport à un profil d'expression génique obtenu de NMCS issus d'un regroupement d'individus. En outre, l'étude d'une sous population cellulaire au sein d'un seul cerveau permet de réduire considérablement le nombre d'animaux pour l'expérience et répond à la règle de réduction du comité d'éthique.

À partir des mêmes animaux, une deuxième population cellulaire contrôle non marquée, les NCP des couches II/III du cortex cérébral, a été purifiée (2 000 cellules) sur la base de leur taille et leur granulosité.

Nous avons démontré la qualité de notre purification par une observation microscopique avant et après FACS. Celle-ci a été renforcée par une analyse des profils d'expression des gènes exprimés par les neurones de la couche V du cortex, notamment les NMCS, via des approches de qPCR ou de séquençage d'échantillons sauvages de 90 jours. De même, une analyse du niveau d'expression de gènes exprimés par les NCP et de gènes spécifiques d'autres populations cellulaires présentes dans les mêmes couches corticales que ces deux populations triées a été réalisée. Un enrichissement de l'expression de gènes typiques des NMCS dans la population cellulaire marquée par fluorescence, et de gènes typiques des NCP dans la population contrôle est observé. En revanche, il n'a pas été observé d'enrichissement de l'expression des gènes spécifiques d'autres populations cellulaires (interneurones et glies) présentes dans les mêmes couches corticales des deux populations triées.

## RESULTATS

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'approche expérimentale développée permet d'obtenir une population pure de NMCS à partir du cortex cérébral d'une souris adulte. Cette méthode initialement développée pour purifier et analyser l'expression des gènes dans des neurones corticaux adultes d'un cerveau à l'aide de RNA-seq (Marques et *al.*, en cours de rédaction) présente de nombreuses autres applications, telles que l'étude d'autres populations neuronales (les NCP par exemple) dans d'autres espèces et dans un contexte aussi bien physiologique que pathologique.

## **FACS purification of adult corticospinal motor neurons from individual mouse brain**

Christine Marques<sup>1</sup>, Mathieu Fischer<sup>1</sup>, Claudine Ebel<sup>2</sup> and Caroline Rouaux<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm UMR\_S 1118, Université de Strasbourg; Faculté de Médecine; Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Inserm UMR\_S 964, CRNS UMR\_S 7104, Université de Strasbourg; IGBMC; Strasbourg, France.

\* corresponding author: [caroline.rouaux@inserm.fr](mailto:caroline.rouaux@inserm.fr)



### **ABSTRACT**

Here, we present a protocol to purify adult cortical excitatory neuron populations by fluorescent activated cells sorting (FACS). The purification of fluorescently labelled cortical neurons is based on the microdissection of the regions of interest followed by optimized enzymatic digestion, mechanical trituration, density gradient separation of neurons from debris, fixation with ethanol and FACS. When used to purify corticospinal motor neurons (CSMN), this protocol produces yields of about two thousand CSMN from one single brain, and this amount of cells is sufficient to perform transcriptomic analyses such as RNA sequencing. The purification of adult cortical neurons enables to study late developmental stages, response to injury and diseases, including neurodegeneration. The entire process of neuronal purification takes less than 6 hours.

## INTRODUCTION

Over the last two decades, the development of new methods to isolate neurons together with new sequencing tools has provided a breakthrough in our understanding of the molecular mechanisms that control the development and diversity of individual neuronal populations of the cerebral cortex. Indeed, several laboratories have developed fluorescence-activated cell sorting (FACS) of cortical neuron populations at embryonic and early postnatal ages and applied it to cell culture or gene expression analysis<sup>1-6</sup>. Yet, the technique has been so far limited to immature neurons, preventing the investigation of molecular mechanisms taking place in individual cortical neuron populations in response to injury, disease and neurodegeneration. The main reason relies on the fragility of adult, mature neurons in comparison with their embryonic and early postnatal immature counterparts that largely prevented their isolation in number sufficient to carry transcriptomic analyses. Here, we propose a protocol adapted to the purification of fluorescently labelled individual adult cortical neuron populations that can virtually be adapted to any neuronal population under healthy and diseased conditions. Using this technique, we recently reported a temporal RNA sequencing (RNAseq) analysis of corticospinal motor neurons (CSMN) as they degenerate in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (Marques *et al.*, article 1 in preparation).

### Development of the protocol

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease leading to progressive paralysis and death within a few years. At the cellular level, ALS is characterized by the combined degeneration of CSMN and spinal and bulbar motor neurons (SMN), and the denervation of skeletal muscles that induces paralysis. A growing body of recent evidences from the genetic, clinics and pathology of ALS patients, points to the cerebral cortex as a potential starting point of the disease (reviewed in <sup>7,8</sup>). As appointed intermediary between the cerebral cortex and the spinal cord, CSMN seem of particular relevance to disease onset and progression. Yet, very little is known about their exact role in ALS and about the molecular mechanisms behind their degeneration. To gain insight into these mechanisms, we sought to purify this neuronal population and conduct a temporal transcriptomic analysis.

FACS has already been applied to purify genetically labelled mouse adult striatal neurons<sup>9</sup> or fluorescent antibody-labelled adult rat neurons<sup>10</sup>. However, no individual, no single or combination of genetic or proteomic markers exist to uniquely identify CSMN. Yet, purification of retrogradely labelled adult CSMN proved extremely challenging past the post-natal day 10<sup>11</sup>. Finally, the successful applications of these protocols required large numbers of animals.

We therefore developed a protocol to sort a retrogradely labelled adult CSMN from the cerebral cortex of individual mouse, by FACS, and routinely obtained 700 to 2500 cells of high purity per mouse brain. The protocol detailed here has been adapted from an initial protocol developed to purify embryonic cortical neuron populations<sup>3</sup>. The key optimizations that now enable the purification of adult cortical

neuron populations include: *i*) the use of a medium containing Hibernate, to control osmolarity and pH<sup>12</sup>, *ii*) adaptation of the amount and duration of papain digestion<sup>2,12</sup>; *iii*) the sequential use fire-polished Pasteur pipettes of progressively decreasing diameter during trituration to limit cells lysis<sup>10,13</sup>; *iv*) the application of a density gradient to remove small debris that enabled to reduce the sorting duration of 60%<sup>10</sup>; *v*) the gentle fixation of the cells with 70% ethanol to maintain their integrity during sorting.

### **Applications of the method**

We previously applied the purification of adult CSMN from individual mouse brains under both healthy and neurodegenerative conditions to transcriptomic analyses (Marques *et al.*, article 1 in preparation). However, the procedure may lend itself to other applications listed below.

#### *Species and neuronal type studies*

The protocol is suitable to purify other fluorescently labelled neuronal populations from the cerebral cortex or other regions of the central nervous system, under physiological or diseased conditions, from various species. Mouse CSMN specific identification was achieved by retrograde labelling from the spinal cord<sup>14</sup>, but other ways of labelling the neurons of interest can be envisioned, such as viral retrograde transduction<sup>15</sup>, Cholera Toxin B (CTB) conjugation to green fluorescent microbeads<sup>11</sup>, genetic labelling<sup>9,16</sup>, immunolabelling<sup>6</sup> or overexpression of genes encoding fluorescent protein delivered by electroporation<sup>5</sup>.

Important considerations in adapting this protocol to other species and or neuronal populations are the volumes of the various solutions listed below, as they were optimized for working with small amounts of microdissected tissues from individual mouse brains. Numbers listed may thus need to be scaled up or down depending on the amount of starting material.

#### *Downstream applications*

The protocol was developed to profile gene expression from purified CSMN, using RNAseq. RNA extracted from cells is of high purity, and can be used for different downstream applications, such as qPCR<sup>4</sup>, microarrays<sup>2,3,17</sup>, single-cell sequencing<sup>18</sup> or microfluidic technologies<sup>19,20</sup>. However, it is important to highlight that the selection of the downstream application will depend on the particular goals of the study, and the abundance of the neuronal type of interest, since it will determine the yield of RNA.

### **Comparison with other methods**

Several alternatives to FACS have been employed to purify neuronal populations from complex tissues after cellular dissociation. Current methods rely on manual aspiration of fluorescent cells<sup>13,21</sup>, density gradient<sup>12</sup>, immunopanning of neurons with specific antibodies alone<sup>22,23</sup> or in combination with retrograde labelling<sup>11,24</sup>. Each of these methods has unique advantages compared to FACS methodology, as they are relatively inexpensive and gentler on cells. However, they also suffer from disadvantages

compared to FACS methodology. For example, manual aspiration of cells needs a high level of proficiency of the technician, and is limited in terms of cell numbers. Immunopanning technology requires the availability of an antibody that recognizes a cell surface epitope specific to the neuronal population of interest. Density gradient doesn't ensure the purification of one given specific neuronal population, but rather separates cell categories (neurons, microglia, astrocytes) depending on the gradient applied. Compared to these techniques, the FACS appears more versatile, reliable and reproducible.

Other methods have relied on the identification of other neuronal types of interest without tissue dissociation. Among them, the laser-capture microdissection can be applied to thin fixed section, upon labelling or not<sup>25,26</sup>, but this technique requires expensive equipment, is laborious and time-consuming, and provides very low levels of molecular products. More recently, the ribosomal tagging technique (TRAP/RiboTag) has been applied to directly isolate mRNA from selected neuronal populations upon tissue homogenization<sup>27,28</sup>. Its major advantage is that it does not require the maintenance of the cellular integrity throughout several delicate steps of dissociation and purification. Yet, it is limited to mRNA and information from non-coding RNA is lost, and requires specific transgenic mouse lines that prevent its application to neuronal populations for which no genetic marker exists. Last but not least, it is noteworthy that both of these techniques produce samples with high contamination.

### **Experimental Design**

#### *RNase-free technique and RNA integrity*

Working under RNase-free conditions is necessary to prevent RNA degradation. Because RNases are abundant and stable enzymes, it is necessary, before starting, to decontaminate benches and materials with RNase-decontaminating reagents such as RNaseZap (Ambion, Thermo Fisher Scientific) or equivalent. Whenever possible, certified RNase-free reagents, especially tubes and tips, should be used. Gloves have to be often changed. In addition, RNase activity can be minimized by keeping the samples at 4 °C, and adding recombinant RNase inhibitors, such as RNazin (Promega), to the various solutions.

#### *Contamination*

We recommend to filter all the solutions and to manipulate them under a laminar flow hood to avoid contamination.

#### *Freshly prepared solutions*

Solutions containing Hibernate medium, involved in the control osmolarity and pH, have to be freshly prepared just before starting the protocol and aliquoted in carefully closed tubes of adapted volume to limit air exposure.

#### *Density gradient to remove cell debris*

To purify very abundant neuronal populations, follow the protocol the protocol followed without the step of density gradient. For small neuronal populations instead, we highly recommend performing the Steps 27 and 28 in order to remove small debris and to reduce the FACS duration.

### *Trituration*

Homemade fire-polished Pasteur pipettes are necessary to ensure gentle trituration. The decreasing diameters have to be adapted to the size of the microdissected tissues and of the neuronal population of interest.

### *Cell fixation*

Cell fixation is highly recommended to purify adult neurons. 70% ethanol is ideal to maintain RNA integrity and quality, as opposed to other fixatives such as PFA or RNAlater.

### *FACS parameters*

FACS parameters have to be adapted to the selected fluorophores and neuronal types. For adult neurons, sort should be performed at a very low speed of 400 events/sec, and a low pressure of 12 psi in order to maintain cell integrity. Low-binding tubes should be used to collect the neurons. We also recommend gently homogenizing the cell suspension, at regular intervals during the sorting to avoid any obstruction of the flow cell.

### *Number of samples*

Number of samples should not exceed eight tubes to minimize the duration of the whole process and ensure a good yield of purified neurons.

### *Negative control*

Non-fluorescent cells can be collected in parallel to fluorescently labelled neurons, from the same cell suspension, and serve as negative control to verify by PCR the purity of the sorted neurons.

The flow steps of the procedure is presented in **Figure 1**.

### **Level of expertise needed to implement the protocol**

This method requires greater technical expertise than *in vitro* immunopanning and TRAP approaches. If a retrograde labelling is needed, the nanoliter injector and stereotaxic frame can be pricy. The dissociation step requires relatively inexpensive equipment, except for the fluorescence stereomicroscope for microdissection, if needed. The availability of mutualized sorting equipment is highly recommended to greatly lower the costs of the purification.

### **Advantages and limitations**

Our method presents several advantages. First, it allows the purification of one or several individual neuronal populations from single adult mouse brain (1 mouse brain = 1 biological sample or 1 mouse brain = several biological samples). This enables *i*) to limit the overall number of animals needed for a study, and to better meet the ethics requirements, and *ii*) to avoid pooling the animals and to better meet the statistics requirements. Second, the method has been developed to purify adult neurons, and thus enables the study of adult-specific conditions, whether physiological such as aging, pathological such as epilepsy or neurodegeneration, as well as injury.

## RESULTATS

The main limitation of this protocol is that it cannot, as such be adapted to cell culture since it requires the fixation of the cells with 70% ethanol to maintain their integrity and that of their RNA throughout the whole sorting process.

Finally, depending on the abundance of the neuronal population of interest, cDNA amplification may be required and may hamper the analysis of non-coding RNA.

## MATERIALS

### REAGENTS

- Mice (obtained in our animal facility and maintained in their initial FVB/N genetic background)  
**! CAUTION** All experiments involving live rodents must conform to national and institutional regulations. This protocol was approved by Animal Use Committee.
- Green fluorescent microbeads (Green Retrobeads, Lumafluor Inc.) to label CSMN.
- Ketamine (Imalgène 1000, Merial; 100 mg/kg body weight) and Xylazine (Rompun 2%, Bayer; 13 mg/kg body weight)
- Lidocaine (Xylovet 21.33mg/ml, Ceva) local anesthetic
- Buprenorphine (Buprecare multidose 0.3 mg/ml, Axience; 0.15 mg/kg) post-operative analgesia
- Povidone-iodine (Vétédine solution, Vétquinol)
- Ethanol absolute 99.8% (Honeywell, cat. no. 24103-5L-R) to dilute for neuron fixation.
- 70% Ethanol to wash surfaces and hands before use, from absolute Ethanol diluted in ultrapure water.
- Ocular gel (Ocrygel, TVM)
- Phosphate buffered saline (PBS 0.01M pH 7.4 at 25 °C, Sigma, cat. no. P4417-100TAB)
- B27 Supplement (Gibco, cat. no. 17504-001) for neurons viability. B27 is 50 times concentrated and need to be diluted in HibernateA medium. We recommend storing B27 aliquots at -20 °C for convenient handling.
- HibernateA/B27 medium (HABG) (see REAGENT SETUP)
- Glutamax Supplement (200 mM; a stable dipeptide of L-alanyl-glutamin; Gibco, cat. no. 35050-038) to improve cell viability. We recommend storing aliquots of 1 ml at -20 °C for convenient handling.
- HibernateA (HA; BrainBits LLC)
- HA minus calcium (HA-Ca; BrainBits LLC) needed for maximal cell isolation and digestion.
- Papain (Worthington, cat. no. 3119) (see REAGENT SETUP)
- Trypan blue (Sigma, cat. no. T8154) to estimate cell viability on cell counter.
- RNaseZap (Fisher Scientific; cat. no. 10504625) to avoid RNase contamination and RNA degradation
- DNase I (Sigma, cat. no. D5025) (see REAGENT SETUP)
- Ovomuroid (Sigma, cat. no. T2011-5G) (see REAGENT SETUP) to inhibit enzyme papain.
- BSA (Sigma, cat. no. A4161-5G) (see REAGENT SETUP)
- Molecular biology grade water (Sigma, cat. no. W4502) (see REAGENT SETUP)
- Sodium hydroxide (NaOH 0.1N, Fischer Scientific, cat. no. S/4920/65)
- Percoll (Sigma, cat. no. P1644-100) to remove cell debris (see REAGENT SETUP). Three-density step gradient of Percoll is performed.
- Ultrapure water (arium advance & arium pro devices, Sartorius)

## EQUIPMENT

- Alm Retractor with blunt teeth (FST, cat. no. 17008-07)
- Heating pad (Homeothermic blanket systems, Harvard apparatus)
- Microcentrifuge tubes (0.5 ml) to aliquot microbeads
- Castroviejo needle holder (FST, cat. no. 12060-02)
- Stereotaxic device (optional; see Step 8)
- Nanoliter injector (Nanoject II, Drummond Scientific)
- Syringe (Hamilton 5 µl) with a 32-gauge needle (Fisher Scientific)
- Mineral oil (Sigma, cat. no. M8410-100ML)
- Needle (FST, cat. no. 12050-01)
- Silk suture
- Syringe (1 ml) with a 25G x 5/8" needle (TERUMO, cat. no. SS+01H25161) for anaesthesia
- Glass capillaries (3.5" Drummond, cat. no. 3-000-203-G/X)
- Vertical micropipette puller (Model P-30, Sutter instrument)
- Aluminium foil
- Adult mouse brain slicer, 1.0mm coronal slice intervals (Zivic instruments, cat. no. BSMAS001-1)
- Mini perforated spoon (Moria MC17C, FST, cat. no. 10370-19)
- Angled 30° knife (FST, cat. no. 10056-12)
- Dumont #5 forceps (FST, cat. no. 11252-20)
- Adson serrated (FST, cat. no. 91106-12)
- Surgical scissors, sharp/sharp (FST, cat. no. 91 402-14), big scissors
- Fine scissors, straight (FST, cat. no. 91460-11), medium scissors for skin
- Noyes scissors, straight (FST, cat. no. 15012-12), small scissors for dissection
- Vannas scissors, straight (WPI, cat. no. 500086), scissors for laminectomy
- Single edge industrial blades (Personna Industrial Division, cat. no. 94-462-1)
- Centrifuge (Eppendorf, cat. no. 5424R)
- Petri dish 100 mm x 20 mm (BD Falcon, cat. no. 353003)
- Petri dish 35 mm x 10 mm (Corning, cat. no. 430165)
- 15 ml & 50 ml polystyrene centrifuge tubes (Dutsher, cat. no. 380505 & 380502)  
▲ **CRITICAL STEP** Polyethylene and polypropylene are toxic to neurons.
- Cell strainer (BD Falcon, cat. no. 352350), 70 µm Nylon recommended for large neuron collection
- Sterile filter Millex-G5, 0.22 µm (Millipore, cat. no. SLGS033SB)
- Sterile syringe 10 cc (TERUMO, cat. no. 55-10ES)
- Vertical laminar flow hood (Bioblock scientific)
- Centrifuge for 15 ml tubes, 4 °C, up to 800g (Allegra X-12R centrifuge, Beckman Coulter)



## RESULTATS

- Water bath shaker (polytest 20, Bioblock scientific, cat. no. 86507,) at 37 °C.
- Glass Pasteur pipette, 230 mm, cottoned (Fisherbrand, Fisher Scientific, cat. no. 11785098)
- Stage micrometer (Micromètre objectif au 1/100<sup>m</sup>/<sub>m</sub>, Nachet)
- Fluorescence stereomicroscope SMZ18 (Nikon) for microdissection
- AxioImager.M2 microscope with ApoTome.2 module and ZEN 2 software (Carl Zeiss)
- Round-Bottom Polystyrene tubes, 5 ml & caps (FACS) (Falcon, cat. no. 352235 & 352032)
- 1.5 ml low binding RNase-free tubes (eppendorf, cat. no. 022431021)
- Nutating mixer (VWR, cat. no. 82007-202)

### REAGENT SETUP

**HA** Hibernate has amino acids, salts, glucose and vitamins and controls the pH while working outside the CO<sub>2</sub> environment of an incubator. Keep solution at 4 °C (for use in Step 11).

**HABG** Prepare medium containing 30 ml HA, 1X B27, 0.05 mM Glutamax for one brain. Adjust pH solution to 7.35 with NaOH 0.1 N. Aliquot 2 ml into each of 5 ml tube and store at 4 °C (for use in Step 19). Aliquot 4 ml into a 15 ml tube and store at 4 °C (for use in Steps 17 and 19). Aliquot 4 ml into a 15 ml tube and store at 4 °C (for use in Step 24). Aliquot 20 ml into two 50 ml tubes and store at 4 °C (for use in Steps 25–29). **▲ CRITICAL STEP** This medium has to be prepared the day of the dissociation and stored at 4 °C or on ice, until used. This medium has to be aliquoted to avoid repeating opening and closing of the tube. For a large piece of tissue, increase the volume of medium to accommodate the greatest tissue mass.

**Papain** For tissue digestion, prepare 34 U.ml<sup>-1</sup> papain in 2.5 ml HA-Ca, 0.5 mM Glutamax and DNase I (100 U.ml<sup>-1</sup>) and adjust pH to 7.35 with NaOH 0.1 N. Filter-sterilize into a 15 ml polystyrene tube. Store on ice until ready to use, leaving for no longer than 3 h. This volume is sufficient for microdissected layer V or III motor cortex from one-brain mouse. For larger tissues, increase the volume of papain adequately. **▲ CRITICAL STEP** Worthington papain has proven superior to papain from Sigma. Papain solution has to be done just the day of the experiment, and can be put at 37 °C for 5 min before enzymatic digestion to activate the enzyme.

**Enzyme inhibitor** Prepare 50 ml Ovo/BSA solution by adding 50 mg Ovomucoïd, 50 mg bovine serum albumin (BSA) in molecular biology grade water, mix gently, filter-sterilize, and store 600 µl aliquots at -80 °C until used (stock solution). On the day of the cell dissociation, dilute enzyme inhibitor solution stock 10 times in HABG fresh solution, and adjust pH to 7.35 with NaOH 0.1 N. Filter-sterilize the solution and keep at 4 °C prior to use (for use in Step 23).

**Percoll gradient** On the day of the cell isolation, dilute Percoll, as described in **Table 1**, in three sterile 15 ml tubes (1–3), as previously described<sup>10</sup>.

Carefully layer each gradient solution in a 15 ml tube: carefully pipette the Medium density solution

## RESULTATS

onto the top of the High density solution, with minimal disturbance to layer 1. Follow with layer 3 to complete the formation of a density gradient. ▲ **CRITICAL STEP** The volumes in this protocol are designed for microdissected layer V or III motor cortex from one brain mice.

### EQUIPMENT SETUP

**Glass capillaries** Stretch the capillaries to obtain a glass needle with vertical micropipette puller (Model P-30, Sutter instrument, Heat 2: 999, Pull: 600).

**230 mm Glass Pasteur pipette, cottoned** Fire-polish the tip of pipettes to four different diameters: 100, 200, 400 and 600  $\mu\text{m}$ , under binocular and with a stage micrometer. Autoclave to sterilize.

## PROCEDURE

### Surgery (Steps 1-10)

The surgery was adapted from a procedure previously described<sup>24</sup>.

#### Preparation before the day of surgery ● TIMING 5 min

1| Make 15 µl aliquots of green fluorescent microbeads into 0.5 ml amber tubes (for light protection) and store at 4 °C until used.

#### Retrograde injection ● TIMING 20 min

2| Anaesthetize Postnatal 25 mice using ketamine (100 mg/kg of body weight) and xylazine (13 mg/kg of body weight) solution.

#### ? TROUBLESHOOTING

3| Place mice on a surgical board containing a heating pad to control body temperature during the procedure.

4| After having shaved behind the neck (at the back of the skull), disinfect and make an incision of the skin from the beginning of the shoulder blades along the midline until the base of the skull.

▲ **CRITICAL STEP** Length of the cut has to not be more than 1cm.

5| Using sharp scissors and thin forceps, cut the first muscle layer along the midline, and spread the second muscle layer very gently by mainly pulling them apart.

▲ **CRITICAL STEP** Do not make the opening longer than from the base of the skull to the beginning of shoulder blades.

6| Using a retractor with blunt teeth, spread the muscles and the opening very gently to visualize the cervical part of the vertebral column.

▲ **CRITICAL STEP** The retraction has to be very gentle.

7| Perform a laminectomy in cervical (C3-C4) region of the spinal cord.

▲ **CRITICAL STEP** Do not remove more than 1 vertebra, and remove it very carefully with a thin forceps without touching the spinal cord to not damage it.

8| Place mice onto a stereotaxic platform equipped with the nanoliter injector, and using a pulled glass capillaries (micropipette) (**Fig. 2a**), inject at one side of the midline, 125 µl of green fluorescent microbeads sequentially by making five pressures of 23 nl by going up from the bottom of the dorsal

funiculus to the top after each pressure. Wait 30 sec between each injection and 1 min after the last. After the injection, slowly retract the needle, and repeat this step to the other side of the midline to label CSMN from both hemispheres (**Fig. 2b**).

▲ **CRITICAL STEP** Be careful to not pierce the whole spinal cord. Before entering in the spinal cord, test that beads do not obstruct the micropipette by performing one injection. Between each animal clean the needle with a cotton swab humidified with BPS, and pull up the microbead solution with the nanoliter injector to avoid obstruction of the thin part of micropipette.

### ? TROUBLESHOOTING

9| Suture the muscle tissue and the skin with needle and silk suture. Disinfect the sutured skin with povidone-iodine and put local lidocaine anaesthetic on it, and inject mice subcutaneously with 0.15 mg/kg buprenorphine. Keep mice warm on a heating pad and observe them until they are awake.

▲ **CRITICAL STEP** Do not overheat the animal.

### ? TROUBLESHOOTING

10| After recovery, return the animals to their cages and follow them 2–3 days to allow complete recovery.

■ **PAUSE POINT** At this time, experiment can be stopped until the desired age of animal required for the study.

## Cell purification (Steps 11-40)

### Preparation on the day of cell isolation ● **TIMING More than 1 h**

11| Prepare fresh solutions mentioned before: HABG solution, Papain solution, inhibitor solution and Percoll gradient and keep it on ice until use.

Clean all instruments (**see Fig.3**) and the surfaces with 70% ethanol and then with RNaseZap to avoid contamination and RNA degradation. Put instruments on UV hood to avoid contamination.

Annotate adequate number of empty: 5 ml PS tubes (for Steps 19 and 26), 50 ml tubes (for Step 29) and 1.5 ml low binding tubes (for Steps 32–34, 38) (**Fig. 3a,b**).

### Preparation for tissue dissociation ● **TIMING 30 min**

12| Anesthetize an adult mouse with ketamine/xylazine (100 mg/kg; 13 mg/kg). After movement ceases, remove mice and confirm anaesthesia by lack of withdrawal reflexes from a toe pinch.

13| Disinfect head with 70% ethanol and decapitate the mice with surgical chisel. Dissect the skin over the top of the skull to expose the skull.

14| Insert scissors into the spinal canal and carefully cut the calvarium on one side nearly to the front.

Avoid damage to the brain. Repeat on the other side.

**15|** Grab the base of the skull with forceps and lift up and forward to remove the skull.

**16|** Insert a sterile RNase-free spatula at the front of the brain to sever the olfactory bulb and optic nerves. Gently lift the brain out of the calvarium.

**▲ CRITICAL STEP** Be careful to avoid contact with the fur.

**17|** Put the brain on a brain slicer matrix (**Fig. 3c**) and cut the brain carefully with blades from the front of the cerebellum to the beginning of the olfactory bulb. Transfer sliced brain section to a dissection dish filled with HABG kept on ice, by gently slipping them by pipetting HABG with 1 ml pipette (**Fig. 3d**).

**▲ CRITICAL STEP** Be sure that all sections are covered by HABG.

**18|** Place 15 ml tube with papain solution in the shaking water bath at 37 °C for 8 min to equilibrate temperature.

**19|** Under a fluorescence stereomicroscope, rapidly dissect layer II/III containing unlabelled callosal projection neurons, followed by the layer V containing labelled CSMN visualized in 488 nm from the sliced brain (**Fig. 4**). Put microdissected tissues with 1 ml pipette into 5 ml PS tubes containing 2 ml HABG at 4 °C.

**▲ CRITICAL STEP** Be careful to change your tips for each tissue.

### ? TROUBLESHOOTING

#### Tissue digestion ● TIMING 40 min

**20|** Remove the HABG supernatant from each 5 ml PS tube and add 2 ml of Papain enzyme solution. Transfer tubes with tissue to a shaking water bath at 37 °C for 30 min. Shake for 30 min at a speed just high enough to suspend the tissue.

**▲ CRITICAL STEP** Seal cap region of tubes with parafilm to protect from the water bath.

**21|** Five min before the end of Papain incubation, place 15 ml tube containing enzyme inhibitor in the shaking water bath at 37 °C to equilibrate temperature.

**22|** Take tubes from water bath clean with 70% ethanol, remove parafilm from the caps and allow to sit for 5 min at room temperature to drop the tissue at the bottom.

**23|** Remove the papain solution from each 5 ml PS tube, add 500 µl of inhibitor solution and let incubate for 1 min. Repeat this step once.

24| Rinse with 1 ml of cold HABG and keep tubes on ice. Allow the pieces to settle for 1 min and repeat the step once. Remove supernatant and add 800  $\mu$ l of cold HABG.

▲ **CRITICAL STEP** tubes will be kept on ice from this step.

### Cell Dissociation from tissue pieces ● **TIMING 30 min**

25| Using the sterilized cottoned Pasteur pipette with the fire-polished tip, triturate approximately five times (up and down). Begin with the larger diameter 600  $\mu$ m.

▲ **CRITICAL STEP** Triturate really gently by sucking the tissue up into the pipette, without air bubbles, and emptying the contents back into the tube, without air bubbles. Be careful to not triturate too vigorously to not break cells.

▲ **CRITICAL STEP** Trituration time has to be limited and do not introduce bubbles. The presence of DNA in the tube can be the result of too much trituration or not well prepared fire-polished tip Pasteur pipette (too narrow).

### ? **TROUBLESHOOTING**

26| Allow the pieces to sit for 1 min. Gently pipette with a 1 ml plastic pipette the supernatant and transfer it along the wall of an empty 5 ml PS tube.

27| Re-suspend the sediment from the first tube in 400  $\mu$ l of HABG.

28| Repeat Steps 25, 26 and 27, by changing each time the Pasteur pipette with the fire-polished tip 400  $\mu$ m, 200  $\mu$ m and finally 100  $\mu$ m. Combine the supernatants from each trituration in the same adequate annotated 5 ml PS tube to make approximately 2 ml of suspended cells.

29| Humidify the 70  $\mu$ m cell strainer on the 50 ml annotated tubes with 400  $\mu$ l of cold HABG. Filter the cell suspension and rinse the cell strainer with 400  $\mu$ l of HABG.

### Separation of cells by density gradient centrifugation ● **TIMING more than 50 min**

30| Transfer carefully the cell suspension along the wall and to the top of the prepared Percoll density gradient (**Table 1**). Centrifuge the gradient at 430g for 3 min at 4 °C in the Beckman Coulter centrifuge.

31| Remove the opaque upper layer (approximately 2 ml) containing cellular debris. Centrifuge 5 min at 550g at 4 °C to pellet the cells.

32| Discard the supernatant carefully by aspiration and finish with 1 ml pipette to not take the pellet. Immediately re-suspend the cells in 275  $\mu$ l of PBS 1X containing RNasin to inhibit RNase (1/40). Transfer cell suspension in 1.5 ml low binding tube and immediately add drop to drop 700  $\mu$ l of cold

## RESULTATS

ethanol absolute for cell fixation. Seal tubes with parafilm to avoid ethanol evaporation.

**33|** Incubate in dark in 30 min at 4 °C on a mutating mixer. Centrifuge the fixed cell for 5 min at 4 °C at 250g. Remove the supernatant. Add 400 µl of PBS 1X containing RNasin (1/40) in the tube and loosen the cell pellet by flicking the bottom of the tube with a finger. Keep cells at 4 °C.

**34|** Prepare 1.5 ml low binding tubes by adding 400 µl PBS 1X containing RNasin (1/20) to collect sorted cell during FACS. Keep tubes at 4 °C.

### **Cell sorting ● TIMING More than 50 min**

**35|** Parameter the FACS Aria II (BD Biosciences) instrument to sort cells with a pressure of 12 PSI and 100 µm nozzle.

**36|** Make sure before starting that liquid drops in the middle of the collection tube by adjusting the flow.

**37|** Prior to process the samples with FACS, use a negative control (corresponding to a sample that was microdissected in the same region of fluorescent cells but in unlabelled brain and processed in parallel of the positive sample but that do not contain labelled cells) and small proportion of the sample containing fluorescent cells of interest to determine sorting criteria. First, gate cells from negative sample and positive sample according to the fluorescence parameter to exclude non-specific labelling (auto-fluorescence) and to select fluorescent cell population with acceptable false-positive ratio (0.1% of cell body related-events). Secondly, fluorescent-gated cells are then gated on their light scattering characteristics: size (forward scatter: FSC) and granularity (side scatter: SSC) to remove cell debris (**Fig. 5**).

**38|** Homogenize gently tubes and sort fluorescent cells at 400 events/s into low-binding microfuge tubes containing PBS 1X/RNasin solution that have been previously carefully annotated.

**▲ CRITICAL STEP** During FACS sorting, we recommend homogenizing tubes at least once as cells have the tendency to agglomerate and precipitate to avoid obstruction of the flow cell. Before the end of the sort, we also recommend adding 50 µl of PBS/RNasin solution in the tube to maximize yield of sorted neuron.

**39|** Immediately after FACS, centrifuge cells at 250g for 5 min at 4 °C. Remove carefully a maximum of supernatant.

**40|** Place samples immediately on dry ice to avoid cell death and RNA degradation. Store tubes at -80 °C until use.

### ● TIMING

For surgery, the entire procedure for one animal can be performed in 20 min.

For purification, the entire procedure from animal anaesthesia to sorted cell centrifugation can be performed in 3h30min.

### ? TROUBLESHOOTING

Troubleshooting advice can be found in **Table 2**.



### ANTICIPATED RESULTS

This protocol leads to purification of samples of high purity (> 95%) with a proficient and well-trained experimenter. It is thus highly recommended to carefully learn and practice the procedure on training animals. Yields will vary depending on the nature of the neuronal population. However, to allow comparison, in our case yield of sorted cells can vary from 700 to 2,500 cells from one adult mouse brain (Marques *et al.*, article 1 in preparation). This variation can be explained by the quality of the initial retrograde labelling (number and brightness of the labelled neurons) and the quality of the trituration.

These neuronal amounts give rise to 1 to 2.7 ng of RNA (Marques *et al.*, article 1 in preparation) with a RNA integrity (**Fig. 6b**) around 6. To obtain the maximum of cDNA, we recommend avoiding RNA extraction and to process to direct cDNA synthesis upon lysis of the cell pellet.

We verified the quality of our purification by observation of pre-FACS and post-FACS cells under a fluorescence microscope (**Fig. 6a**). In the cell suspension, we observed a mix of fluorescent and non-fluorescent cells; conversely we observed only fluorescent cells upon sorting. The quality and identity of the sorted neurons were further assessed by qPCR (**Fig. 6c**) and RNAseq to reveal the expression of known markers in comparison with control cells (**Fig. 6d,e**).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The work has been supported by an ERC starting grant #639737, a Marie Curie career integration grant #618764, an AFM-Telethon trampoline grant #16923 and a Neurex grant to CR, and an Inserm/Région Alsace PhD fellowship to CM.

**REFERENCES**

1. Junger, H. & Junger, W. G. CNTF and GDNF, but not NT-4, support corticospinal motor neuron growth via direct mechanisms. *Neuroreport* **9**, 3749–3754 (1998).
2. Catapano, L. A., Arnold, M. W., Perez, F. A. & Macklis, J. D. Specific neurotrophic factors support the survival of cortical projection neurons at distinct stages of development. *J. Neurosci.* **21**, 8863–8872 (2001).
3. Arlotta, P. *et al.* Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207–221 (2005).
4. Özdinler, P. H. & Macklis, J. D. IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat. Neurosci.* **9**, 1371–1381 (2006).
5. Lodato, S. *et al.* Gene co-regulation by Fezf2 selects neurotransmitter identity and connectivity of corticospinal neurons. *Nat. Neurosci.* **17**, 1046–1054 (2014).
6. Molyneaux, B. J. *et al.* DeCoN: Genome-wide analysis of in vivo transcriptional dynamics during pyramidal neuron fate selection in neocortex. *Neuron* **85**, 275–288 (2015).
7. Geevasinga, N., Menon, P., Özdinler, P. H., Kiernan, M. C. & Vucic, S. Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 651–661 (2016).
8. Eisen, A. *et al.* Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **0**, 1–8 (2017).
9. Lobo, M. K., Karsten, S. L., Gray, M., Geschwind, D. H. & Yang, X. W. FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains. *Nat. Neurosci.* **9**, 443–452 (2006).
10. Guez-Barber, D. *et al.* FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain. *J. Neurosci. Methods* **203**, 10–18 (2012).
11. Dugas, J. C. *et al.* A novel purification method for CNS projection neurons leads to the identification of brain vascular cells as a source of trophic support for corticospinal motor neurons. *J. Neurosci.* **28**, 8294–8305 (2008).
12. Brewer, G. J. & Torricelly, J. R. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* **2**, 1490–1498 (2007).
13. Hempel, C. M., Sugino, K. & Nelson, S. B. A manual method for the purification of fluorescently labeled neurons from the mammalian brain. *Nat. Protoc.* **2**, 2924–2929 (2007).
14. Katz, L. C. & Iarovici, D. M. Green fluorescent latex microspheres: a new retrograde tracer. *Neuroscience* **34**, 511–520 (1990).
15. Jara, J., Villa, S., Khan, N., Bohn, M. & Ozdinler, P. AAV2 mediated retrograde transduction of corticospinal motor neurons reveals initial and selective apical dendrite degeneration in ALS. *Neurobiol. Dis.* **47**, 174–183 (2012).

## RESULTATS

16. Yasvoina, M. *et al.* eGFP expression under UCHL1 promoter genetically labels corticospinal motor neurons and a subpopulation of degeneration-resistant spinal motor neurons in an ALS mouse model. *J. Neurosci.* **33**, 7890–7904 (2013).
17. Molyneaux, B. J. *et al.* Novel subtype-specific genes identify distinct subpopulations of callosal projection neurons. *J. Neurosci.* **29**, 12343–12354 (2009).
18. Ye, Z. *et al.* Instructing perisomatic inhibition by direct lineage reprogramming of neocortical projection neurons. *Neuron* **88**, 475–483 (2015).
19. Spurgeon, S. L., Jones, R. C. & Ramakrishnan, R. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS One* **3**, 1–7 (2008).
20. Geiss, G. K. *et al.* Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat. Biotechnol.* **26**, 317–325 (2008).
21. Sugino, K. *et al.* Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* **9**, 99–107 (2006).
22. Zhang, Y. *et al.* An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* **34**, 11929–11947 (2014).
23. Cahoy, J. *et al.* A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* **28**, 264–278 (2008).
24. Mandemakers, W. Retrograde labeling of corticospinal motor neurons from early postnatal rodents. *Cold spring Harb. Protoc.* **2014**, 372–379 (2014).
25. Kamme, F. *et al.* Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity. *J. Neurosci.* **23**, 3607–3615 (2003).
26. Tietjen, I. *et al.* Single-cell transcriptional analysis of neuronal progenitors. *Neuron* **38**, 161–175 (2003).
27. Heiman, M., Kulicke, R., Fenster, R. J., Greengard, P. & Heintz, N. Cell type-specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP). *Nat. Protoc.* **9**, 1282–1291 (2014).
28. Sanz, E. *et al.* Cell-type-specific isolation of ribosome-associated mRNA from complex tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13939–13944 (2009).

RESULTATS

**Marques *et al.*, Table 1**

**Table 1** | Percoll density gradient preparation

| <b>Solution density</b> | <b>Hibernate A (ml)</b> | <b>Percoll (ml)</b> | <b>NaCl 1M (ml)</b> | <b>Total (ml)</b> |
|-------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| High                    | 1.655                   | 0.398               | 0.047               | 2.1               |
| Medium                  | 1.747                   | 0.316               | 0.037               | 2.1               |
| Low                     | 1.837                   | 0.234               | 0.029               | 2.1               |

Table 2 | Troubleshooting table

| Step  | Problem                        | Possible reason  | Possible solution   |
|-------|--------------------------------|--|---|
| 2     | Dead mouse                     | If the mouse dies upon anaesthesia, it could be due to an inappropriate dosage.  | Test a lower dose of anaesthetic. Use different drugs.  |
| 8     | Needle is obstructed           | Microbeads solution dried at the end of the micropipette   | Clean the end of the micropipette with a cotton swab soaked with PBS solution, and with the nanoliter injector pull up and down the solution. If this method doesn't work, and if the end of the micropipette is enough longer, cut the extremity with scissors, clean the micropipette and try to inject.<br>If the micropipette is too shorter to allow precise injections, change the micropipette.  |
| 9,10  | Infection of the suture region | The sutured skin was not appropriately disinfected.  | Follow the animal and disinfect until complete wound healing.   |
| 19    | Too few labelled cells         | Retrograde injection was not efficient   | If cerebral cortex containing layer V CSMN contains very few if any fluorescent cells, we recommend to not process the tissue and use another animal as final yield of neuron will be too weak.   |
| 25-28 | Low yield of neuron            | Digestion was too short or too long: underdigested tissue requires more trituration to dissociate, conversely overdigested tissue leave cells more fragile.<br><br>Amount of tissue is bigger than the one used in this protocol and also required long trituration that lead to cell death.<br><br>Pipette used was not well fire-polished (diameter too small or opening to sharp) | As trituration is a very sensitive step, make sure that you do not microdissect too large region containing the microbeads (try to dissect as close as you can near the labelled region). If more tissue is required for the experiment, split it equally into tubes and perform tubes in parallel.<br><br>Pasteur pipette has to be fire-polished by checking diameter under binocular with a stage micrometer (Micromètre objectif au 1/100 <sup>m</sup> / <sub>m</sub> , Nachet) |

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1: Flow diagram of the procedure

### Figure 2: Surgical procedure of CSMN retrograde labelling

**a.** Representation of the surgical frame and the mouse position, to place the glass capillary containing fluorescent green microbeads (Lumafluor) at the level of the spinal cord where the laminectomy was performed, and made accessible thanks to the retractor. **b.** Enlargement of the injection site, showing one-vertebra laminectomy with the anterior spinal artery visible. Five injections of green fluorescent microbeads are performed on each side of the anterior spinal artery.

### Figure 3: Equipment needed for microdissection steps

**a.** Illustration of the instruments and the dissection stereomicroscope used for microdissection. **b.** Equipment required for microdissection, including cleaning agent for RNase and filtered tips, instruments for dissection and microdissection, blades and adult mouse brain slicer matrix, 35- and 100 mm dishes, respectively to wash brain just after scalp removal and to dispose brain sections for microdissection under a stereomicroscope, and 5 ml round-bottom polystyrene tube to collect chunks of cortical brain. **c.** Installation of brain adult mouse in the brain slicer matrix. **d.** Typical section obtained after brain slicing on the brain slicer matrix. Sections are placed on the 100 mm dish and recovered with HABG solution to maintain viability of cells during microdissection steps.

### Figure 4: Microdissection of brain tissue for dissociation

**a-b.** One representative coronal image of the brain of a retrogradely labelled mouse, before (**a**) and after microdissection. Cut have been made bilaterally for each microdissected section (**b**). **c-d.** Enlargement of the cortical part of the brain containing layer V CSMN retrogradely labelled, showing sites of microdissection (dashed white line) (**c**), with three microdissected regions: layer 1 which is removed, control CPN-containing layer II/III (**i**) and CSMN-containing layer V (**ii**) (**d**). Isolated microdissected control CPN-containing layer II/III (**i**) and CSMN-containing layer V area (**ii**) used for trituration are enlarged in bottom left and right respectively. CSMN-containing layer V area shows green beads fluorescent labelling absent in control CPN-containing layer II/III.

### Figure 5: Strategy to purify CSMN and CPN by FACS

**a.** Representative coronal image of the cortex of a retrogradely labelled mouse, showing the microdissected areas: the CSMN-containing layer V (green box) and the control layer II/III (white box). **b.** Representative FACS plots showing the purification of the labelled CSMN (P4, green) and unlabelled control CPN (P2, blue) populations. Cells are first gated according to the fluorescence parameter, to exclude non-specific labelling (auto-fluorescence). Fluorescent-gated cells (P1 and P3) are then gated on their light scattering characteristics: size (forward scatter: FSC) and granularity (side scatter: SSC) to remove cell debris (P2 and P4).

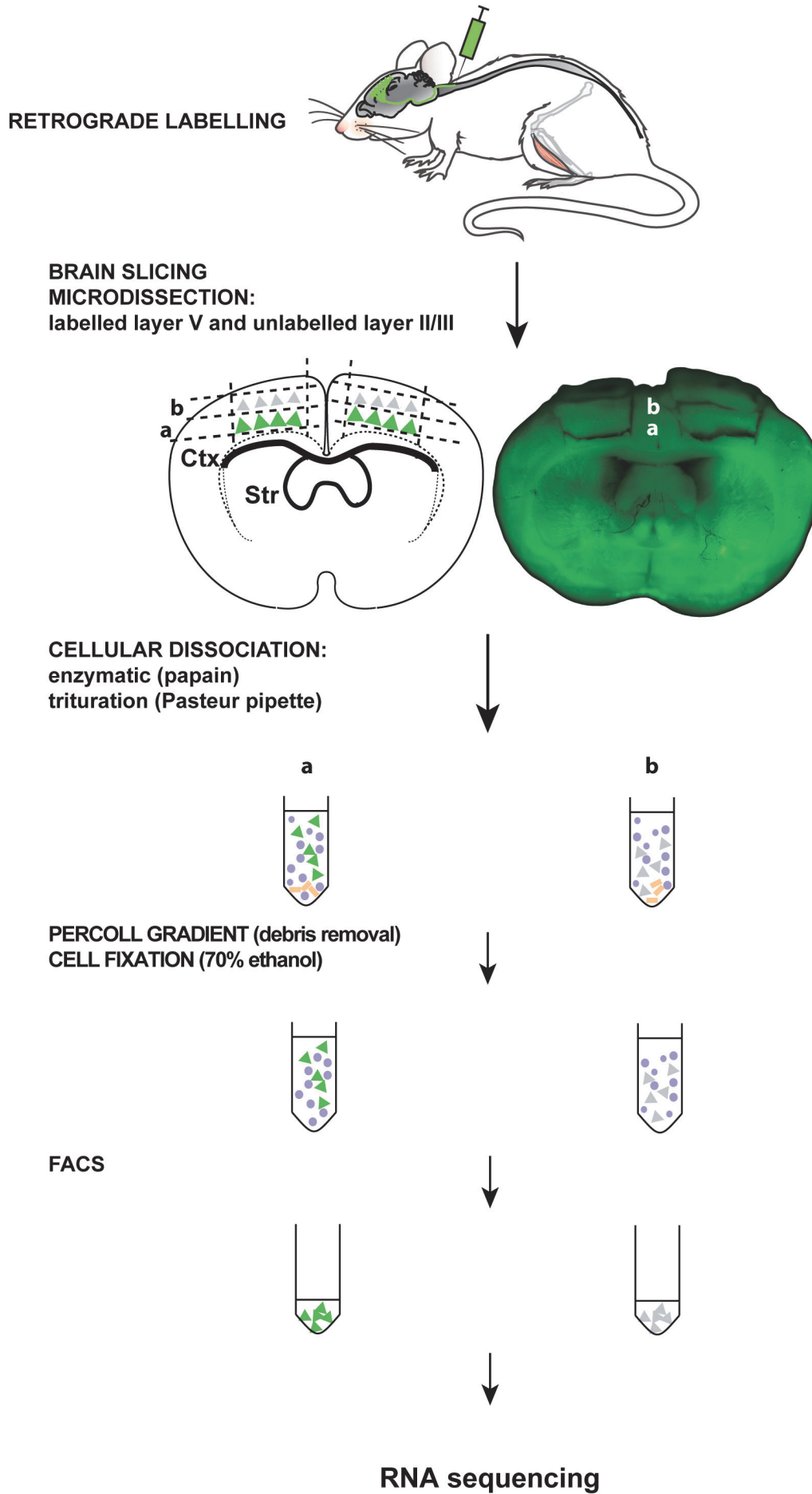
Ctx: cortex; CC: corpus callosum; Sep: septum; LV: lateral ventricle; Str: striatum; SSC: side scatter; FSC: forward scatter.

### Figure 6: Validation of the quality of purification

**a.** Representative images of pre-FACS (top) and post-FACS (bottom) CSMN-containing layer V cell suspension. In the pre-FACS cell suspension, a mix of fluorescent and non-fluorescent cells is observed (top). In the post-FACS cell suspension, only fluorescent cells are observed (bottom). **b.** Example of an electropherogram showing the RNA integrity number (RIN) of RNA extracted from CSMN sorted cells (RIN: 9). **c.** Bar graph representing the normalized expression of known CSMN-expressed genes by qPCR analysis of fluorescent sorted cells versus unlabelled cells sorted from the same layer and the same SSC and FSC FACS parameters. **d-e.** Bar graph representing the normalized expression (read counts/gene length) of layer II/III specific genes (**d**) and CSMN-expressed layer-V genes (**e**), obtained from 90 day-old RNaseq samples.

RESULTATS

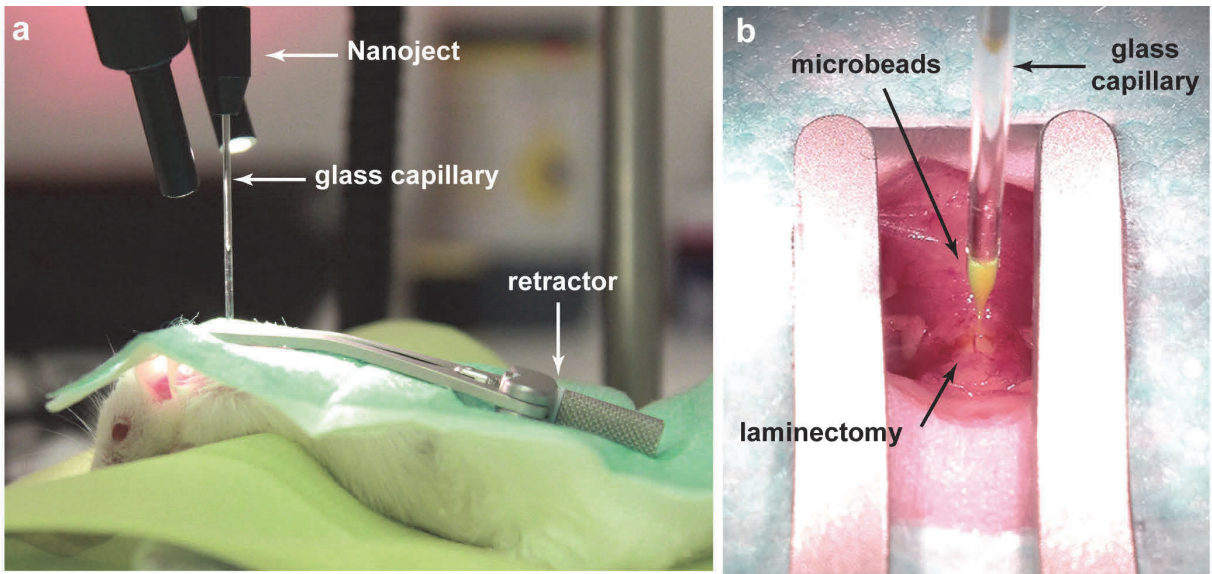
Marques *et al.*, Figure 1





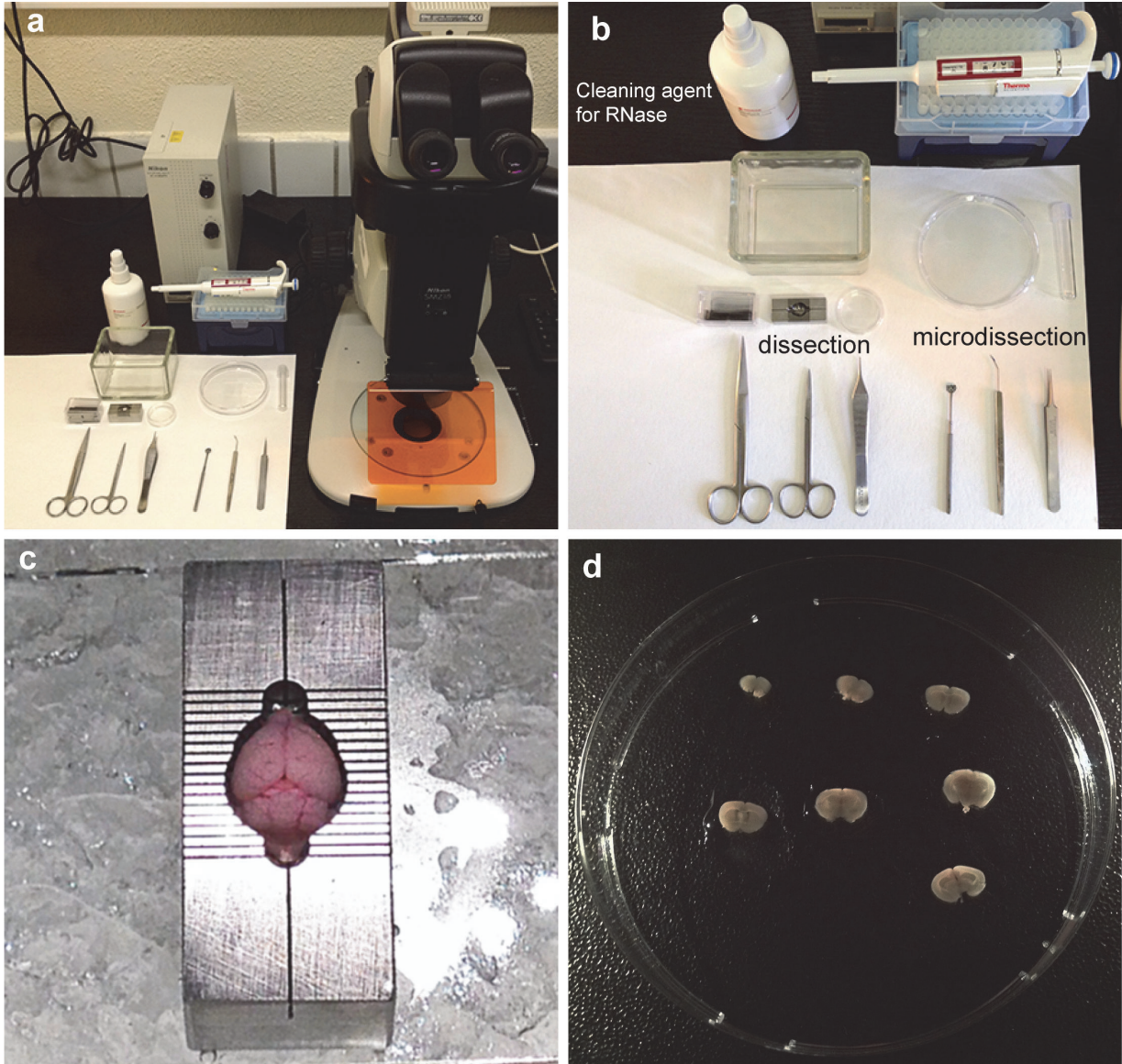
RESULTATS

Marques *et al.*, Figure 2

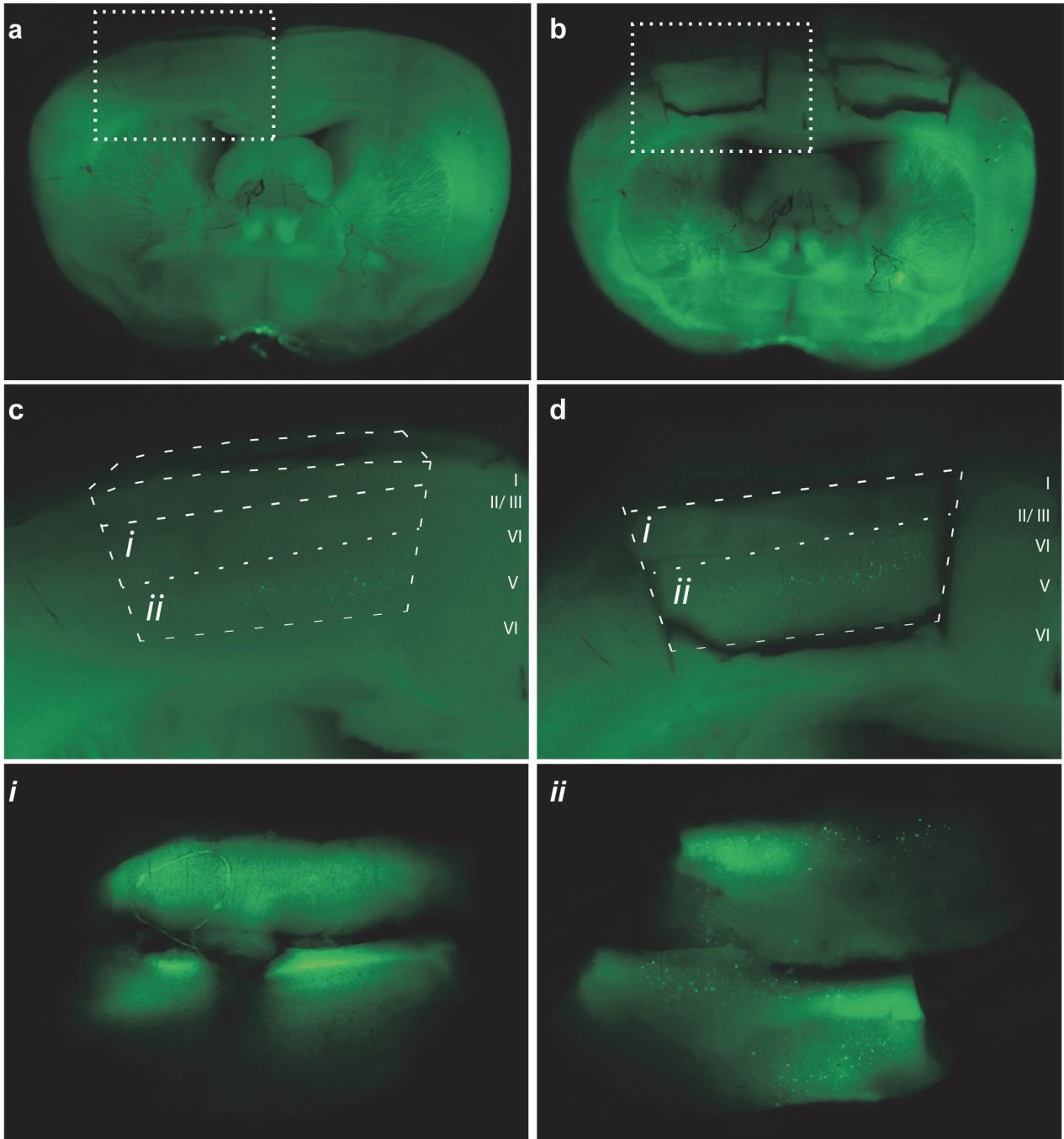


RESULTATS

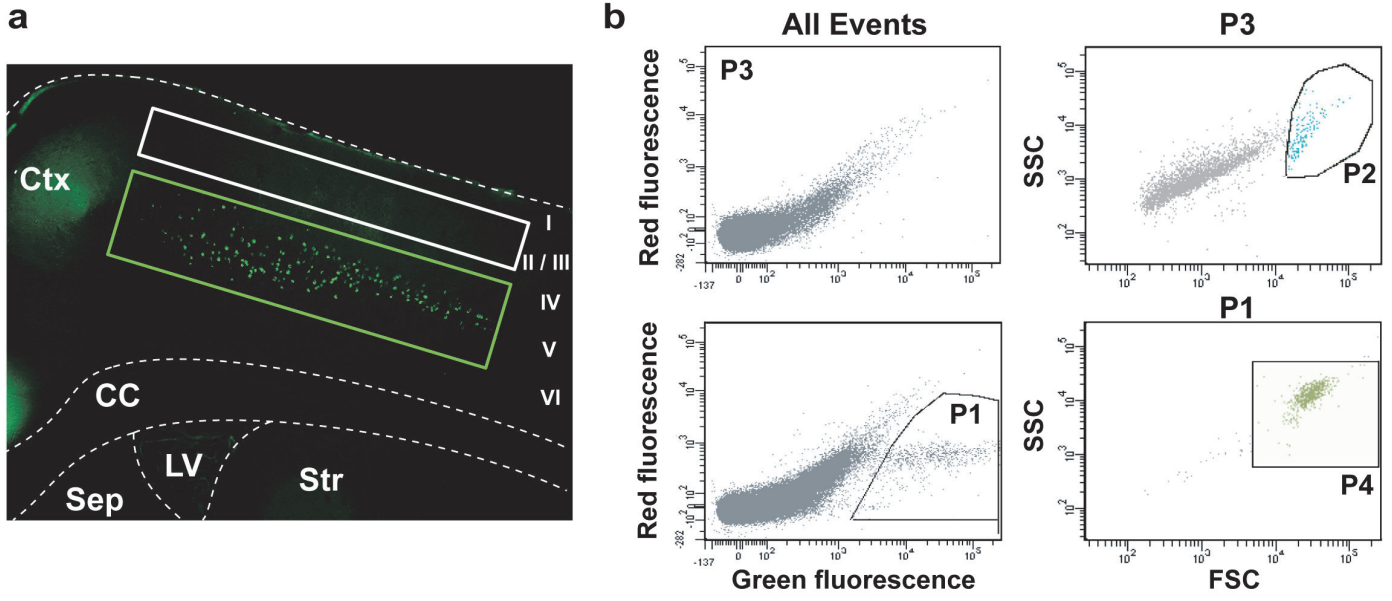
Marques *et al.*, Figure 3

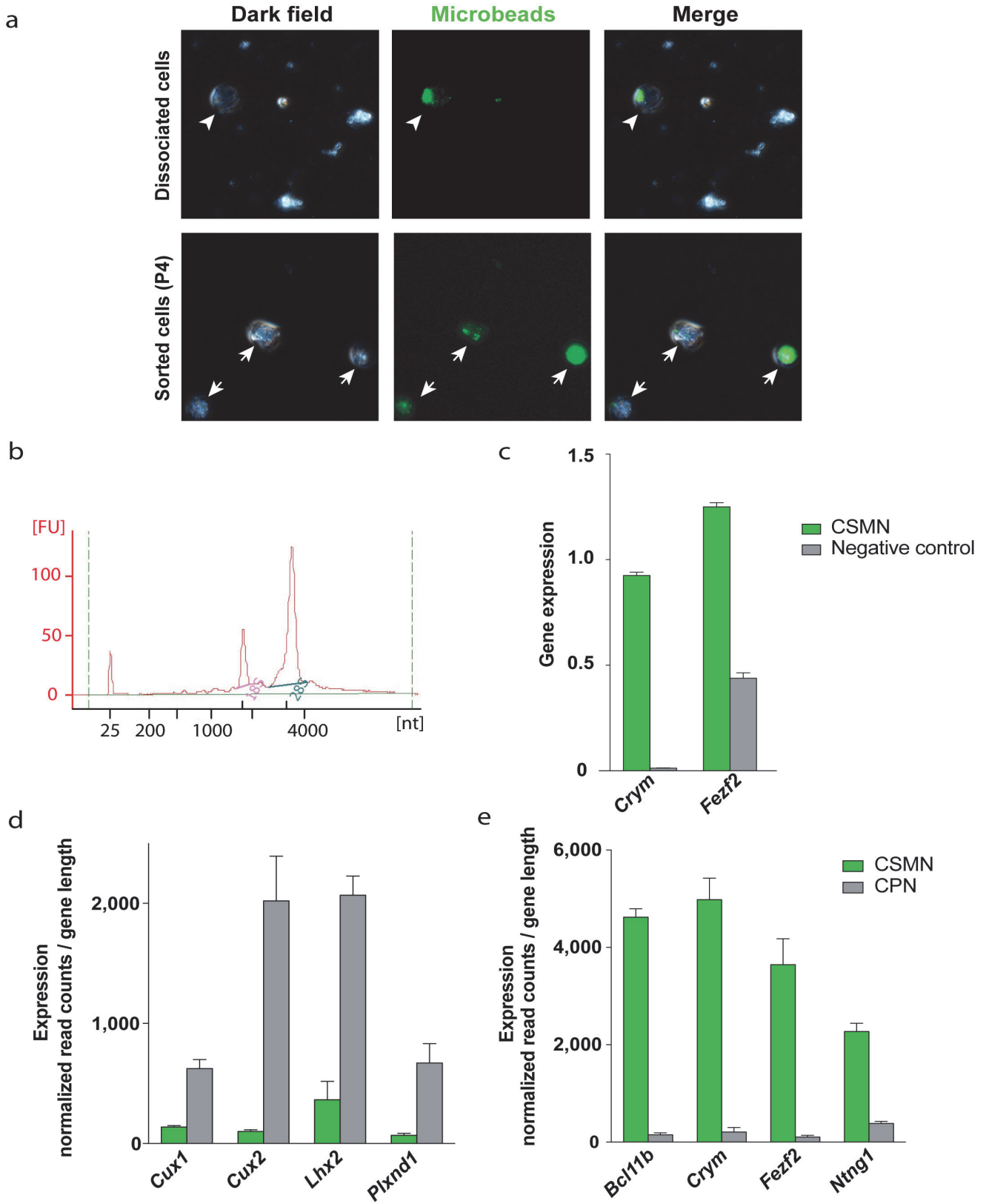


Marques *et al.*, Figure 4



Marques *et al.*, Figure 5





### 3. Caractérisation de la pathologie corticale chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*

#### 3.1 Introduction

Bien que la SLA se manifeste par une dégénérescence progressive des neurones moteurs (NMCS et des MnBS), le rôle des cellules non neuronales environnantes a été suggéré comme étant important pour l'initiation et la progression de la maladie (Ilieva et al., 2009) et ces cellules sont maintenant considérées comme une partie intégrante de la SLA (pour revue, voir (Puentes et al., 2016)). Chez les patients SLA, une microgliose et une astrogliose ont été largement démontrées, en particulier dans la moelle épinière (Kawamata et al., 1992; McGeer & McGeer, 2002; Sasaki & Maruyama, 1994; Troost et al., 1992) et ont également été retrouvées dans les modèles murins *SOD1* (Ilieva et al., 2009; Levine et al., 1999; Morrison et al., 1998). Une implication possible de la microgliose dans la pathologie des NMCS a été suggérée par des travaux antérieurs qui ont montré une microgliose dans le cortex moteur par des analyses histopathologiques d'échantillons post-mortem de patients SLA (Kawamata et al., 1992) et par des études d'imagerie corticale (Alshikho et al., 2016; Turner et al., 2004; Zürcher et al., 2015). Cependant, le moment à partir duquel cette microgliose se met en place et son implication dans la pathologie demeure inconnue. Ainsi il apparaît que contrairement à la pathologie spinale aujourd'hui bien décrite, la pathologie corticale reste très peu connue dans la SLA et les modèles murins de la maladie.

Pour comprendre dans quel microenvironnement les NMCS dégèrent, une comparaison de l'état d'activation des cellules gliales dans le cortex cérébral et la moelle épinière des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* a été effectuée. Pour ce faire, une première analyse par qPCR de l'expression de différents gènes connus pour marquer l'astrogliose et la microgliose a été entreprise. Afin d'approfondir l'analyse de la pathologie corticale, une approche par gène candidat basée sur la comparaison, entre le cortex cérébral et la moelle épinière, de l'expression de gènes connus pour être dérégulés, dans la moelle épinière au cours de la maladie a été développée. Pour cela, les gènes connus pour être dérégulés et associés aux mécanismes physiopathologiques dans la moelle épinière de patients SLA ou de souris transgéniques au cours de la maladie ont été recherchés dans la littérature. Ces gènes sont actuellement testés sur les ARN extraits du cortex moteur et de la moelle épinière lombaire de souris sauvages ou *Sod1<sup>G86R</sup>*, à 30, 60, 90 et 105 jours. Cette étude qui est en cours donnera lieu à la publication (3). L'expression de ces gènes sera ensuite comparée dans la moelle épinière et le cortex cérébral de souris *Sod1<sup>G86R</sup>*.

## 3.2 Matériel et méthodes

### 3.2.1 Animaux

Les souris femelles transgéniques de la lignée FVB/N *Sod1*<sup>G86R</sup>, surexprimant une forme inactive et mutée (substitution de l'arginine par la glycine au niveau du résidu 86) du gène murin *superoxyde dismutase 1 (Sod1)* (Ripps et al., 1995), et leurs contrôles sauvages ont été élevés dans l'animalerie de la Faculté de Médecine de Strasbourg, à une température constante de 22 °C, avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau ont été fournies *ad libitum*. Toutes les procédures expérimentales utilisées ont été autorisées par le Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg.

### 3.2.2 Collection des échantillons

Les souris femelles WT et *Sod1*<sup>G86R</sup> ont été anesthésiées avec une dose létale de pentobarbital sodique et sacrifiées par décapitation à deux âges présymptomatiques, 30 (*N*=4) et 60 jours (*N*=4) et des deux âges symptomatiques, 90 (*N*=4) et 105 jours (*N*=4). Une microdissection du cortex sensorimoteur sous stéréomicroscope (Nikon SMZ18) et un prélèvement de la moelle épinière lombaire ont été réalisés pour chaque souris WT et *Sod1*<sup>G86R</sup> collectée (Figure 1A). Les échantillons des tissus prélevés ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide, puis conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

### 3.2.3 RT-qPCR

Une extraction des ARN totaux des échantillons congelés a été réalisée selon un protocole standardisé. Brièvement, les tissus ont été broyés au TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) dans 1 ml de Trizol (Invitrogen, Groningen, Pays-Bas) à l'aide d'une bille métallique pendant 2 cycles de 3 min à 30 Hz. Les ARN ont ensuite été extraits selon les procédures standards avec le chloroforme, l'isopropanol et éthanol puis stockés à -80 °C jusqu'à utilisation. Un microgramme d'ARN total a été utilisé pour la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) à l'aide de la transcriptase inverse Iscrip (BioRad, Marnes la Coquette, France). L'expression des gènes a été mesurée à l'aide du SYBR Green (2x SYBR Green Supermix, BioRad) en suivant les instructions du fournisseur sur le thermocycleur. Les PCR ont été réalisées selon les conditions suivantes : 95 °C pendant 3 min pour la dénaturation, suivie de 40 cycles de 10 s à 95 °C et 30 s à 60 °C pour l'amplification. Les séquences des amorces (Eurogentec, Seraing, Belgique) utilisées sont les suivantes : *Gfap* (Glial fibrillary acidic protein) : sens 5'-agaacaacctggctgcgtat-3', anti-sens 5'-ggatctcctcctccagcgat-3' ; *Iba1* (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) : sens 5'-ggatctgccgtccaaactga-3', anti-sens 5'-cagcattcgttcaaggacata-3' ; *Cd11b* (ou *Itgam*, *Integrin alpha M*) : sens 5'-agagcaggggtcattcgcta-3', anti-sens 5'-gctggcttagatgcgatgg-3' ; *Dap12* (*DNAX activation protein of 12kDa*) : sens 5'-tgactctgctgattgcctg-3', anti-sens 5'-ggcgactcagtctcagcaat-3' ; *Ng2* (*Neural-gial antigen 2*) : sens

5'-ggggacgtggtctttgtctt- 3', anti-sens 5'- catttacggtggctgatgcg-3' ; *Tbp* (*TATA-box binding protein*) : sens 5'- ccaatgactcctatgacccta- 3', anti-sens 5'- cagccaagattcacggtagat-3' ; *Pol II* (*RNA Polymerase II*) : 5'-aatccgcatcatgaacagtg- 3', anti-sens 5'-tcatccatttatccaccacc-3' ; *Hsp90a1* (*Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1*) : 5'-tactactcggtttcccgtca- 3', anti-sens 5'-cctgaaaggcaaaggtctcca-3'.

La normalisation a été réalisée avec les trois gènes de références : TBP, Pol II et Hsp90a1 pour déterminer le facteur de normalisation avec le logiciel GeNorm Software v3.5.

### 3.2.4 Sélection des gènes candidats d'après les données publiées

La sélection des gènes candidats s'est basée sur des recherches bibliographiques concernant les mécanismes physiopathologiques (neuroinflammation, excitotoxicité, stress oxydatif, métabolisme mitochondrial, stress du réticulum endoplasmique, mort cellulaire, protéasome et autophagie, transport axonal et cytosquelette) associés à la maladie. Une première liste de 84 gènes connus pour être dérégulés au niveau transcriptionnel dans la moelle épinière de patients SLA ou de souris transgéniques modélisant la maladie a été établie (présenté dans le Tableau 1).

### 3.2.5 Analyse statistique

Les valeurs sont exprimées par la moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard à la moyenne). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA). Le test paramétrique de Student (*t-test*) non apparié a été utilisé. Les valeurs de p-value inférieure à 0,05 ont été considérées comme significatives (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 3.3 Résultats et discussion

### 3.3.1 La pathologie corticale semble exclure une réaction gliale massive caractéristique de la pathologie spinale dans le modèle murin *Sod1*<sup>G86R</sup>

Afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la dégénérescence des NMCS au cours de la pathologie, une caractérisation du microenvironnement cortical où se situe cette population a été réalisée. Cette étude vise à déterminer si le cortex présente une réaction gliale massive telle qu'elle a été mise en évidence dans la moelle épinière de patients (Kawamata et al., 1992; McGeer & McGeer, 2002) et de souris *SOD1* (Levine et al., 1999; Morrison et al., 1998). Pour cela, une première analyse du niveau d'expression de gènes exprimés par les astrocytes et les microglies lors de leur activation a été réalisée par qPCR à partir d'ARN extraits du cortex et de la moelle épinière lombaire des souris sauvages et *Sod1*<sup>G86R</sup>. Ces premières analyses ont portées sur des animaux âgés de 105 jours, un stade de la maladie où il a été reporté une inflammation, une astrogliose et microgliose spinales (Ilieva et al., 2009; Levine et al., 1999; Morrison et al., 1998).



## RESULTATS

Le niveau d'expression du marqueur astrocytaire *Gfap* apparaît significativement plus élevé dans la moelle épinière des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* que dans les souris contrôles à 105 jours (sauvage :  $204,2 \pm 22,24$ ,  $N=4$ , *Sod1<sup>G86R</sup>* :  $492,6 \pm 86,91$ ,  $p < 0,02$ ) en accord avec les données de la littérature (Figure 1C) (Nassif et al., 2014). En revanche, il n'est pas modifié dans le cortex de ces mêmes animaux (sauvage :  $354,5 \pm 44,34$ ,  $N=4$ , *Sod1<sup>G86R</sup>* :  $314,8 \pm 35,13$ ,  $p < 0,5$ ) (Figure 1C). Les niveaux d'expression des marqueurs d'activation microgliaux *Ibal* (sauvage :  $179 \pm 23,4$ ,  $N=4$ , *Sod1<sup>G86R</sup>* :  $366,4 \pm 52,22$ ,  $p < 0,02$ ) et *Cd11b* (sauvage :  $209,8 \pm 11,09$ ,  $N=4$ , *Sod1<sup>G86R</sup>* :  $307,3 \pm 35,63$ ,  $N=4$ ,  $p < 0,04$ ), et du marqueur anti-inflammatoire *Dap12* (sauvage :  $166,7 \pm 19,5$ ,  $N=4$ , *Sod1<sup>G86R</sup>* :  $499,5 \pm 118,3$ ,  $N=4$ ,  $p < 0,03$ ) sont significativement plus élevés dans la moelle épinière des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* âgées de 105 jours que dans celle des contrôles sauvages (Figure 1B). Aucune modification significative de l'expression de ces mêmes gènes *Ibal* (sauvage :  $589 \pm 83,02$ ,  $N=4$ , *Sod1<sup>G86R</sup>* :  $676 \pm 18,19$ ,  $N=4$ ,  $p < 0,3$ ), *Cd11b* (sauvage :  $348,2 \pm 29,24$ ,  $N=4$ , *Sod1<sup>G86R</sup>* :  $274,6 \pm 21,74$ ,  $N=4$ ,  $p < 0,09$ ), *Dap12* (sauvage :  $282,7 \pm 22,27$ ,  $N=4$ , *Sod1<sup>G86R</sup>* :  $277,9 \pm 21,98$ ,  $N=4$ ,  $p < 0,9$ ) n'est observée dans le cortex de ces mêmes animaux (Figure 1B).

De manière intéressante, des études, qui ont comparé l'état d'immunoréactivité microgliale dans la moelle épinière et le cerveau de rats *SOD1<sup>G93A</sup>*, ont également montré une augmentation tardive de la réactivité microgliale dans la moelle épinière contrairement au cortex cérébral où aucune microgliose n'est observée (Fendrick et al., 2007; Nikodemova et al., 2014). De même, une autre étude comparative de l'état d'immunoréactivité des astrocytes spinaux et corticaux, menée chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, a révélé une astrogliose spinale dès le début des symptômes. En revanche l'astrogliose corticale n'a été observée que très tardivement. Une microgliose spinale très tardive est également observée (Yang et al., 2011).

L'absence de gliose réactionnelle au niveau cortical pourrait résulter d'une différence d'environnement entre le cortex et la moelle épinière conduisant à des réponses gliales différentes. Elle pourrait être le reflet d'une incapacité des cellules gliales corticales à produire une réponse au stade final étudié due à une possible hyposensibilité de ces cellules aux signaux inflammatoires libérés par les NMCS qui dégénèrent (Nikodemova et al., 2014). En effet, il a été rapporté une plus grande sensibilité des cellules gliales spinales à ces signaux comparativement à celles du cortex (Nikodemova et al., 2014), pouvant expliquer les différences de niveaux d'expression des marqueurs gliaux obtenues entre ces deux structures. Les études qui vont être réalisées à des stades plus précoces (30, 60 et 90 jours) et avec un plus grand nombre de marqueurs de réactivité gliale permettront une meilleure caractérisation de la pathologie corticale au cours de la maladie.

Ces résultats préliminaires indiquent que, contrairement à la moelle épinière, le cortex cérébral des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* ne semble pas être le lieu d'une réaction gliale massive. Ainsi, il

semblerait que le microenvironnement cortical, au sein duquel les NMCS dégèrent diffère de celui où meurent les MnBS.

Enfin, outre la réactivité astrocytaire et microgliale, il a été observé une atteinte oligodendrocytaire marquée par la présence d'inclusions cytoplasmiques pathologiques (telles que des protéines TDP-43 ou FUS), une démyélinisation et leur dégénérescence au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière de patients SLA (Kang et al., 2013; Mackenzie et al., 2011; Nonneman et al., 2014; Philips et al., 2013) et des modèles murins *SOD1*<sup>G93A</sup> (Kang et al., 2013; Nonneman et al., 2014; Philips et al., 2013). Cette atteinte s'accompagne d'une prolifération et d'une différenciation accrues de leurs précurseurs oligodendrocytaires NG2+, un mécanisme compensatoire visant à maintenir un nombre constant d'oligodendrocytes (Kang et al., 2013; Nonneman et al., 2014; Philips et al., 2013). Cette prolifération a également été observée dans le cortex de patients SLA (Kang et al., 2013). De ce fait, une caractérisation de la pathologie oligodendrocytaire, dans le cortex et la moelle des souris *Sod1*<sup>G86R</sup>, a également été entreprise avec une première analyse du niveau d'expression du gène *Ng2*.

De manière étonnante, le niveau d'expression du gène *Ng2* n'est pas modifié dans la moelle épinière des souris *Sod1*<sup>G86R</sup> à 105 jours (sauvage :  $246,3 \pm 14,5$ ,  $N=4$ , *Sod1*<sup>G86R</sup> :  $266,5 \pm 43,16$ ,  $p < 0,6$ ). En revanche, le niveau d'expression de ce gène apparaît significativement diminué dans le cortex cérébral (sauvage :  $233,5 \pm 22,91$ ,  $N=4$ , *Sod1*<sup>G86R</sup> :  $141,4 \pm 14,67$ ,  $p < 0,0$ , Figure 1D).

Ces résultats préliminaires sont difficilement comparables à ceux de la littérature puisqu'ils sont issus d'expériences réalisées à des échelles moléculaires différentes. En effet, une approche transcriptionnelle a été utilisée dans cette étude tandis que les données de la littérature portent sur des marquages protéiques NG2+ (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Il est possible d'envisager que la diminution du niveau d'expression du gène *Ng2* (ARNm) dans le cortex cérébral des souris *Sod1*<sup>G86R</sup> à 105 jours puisse être compensée par une forte augmentation de la machinerie traductionnelle, aboutissant à une augmentation protéique de NG2+ (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Des études immunohistologiques vont être réalisées afin de tester cette hypothèse.

Enfin, bien que trop préliminaires pour être interprétées à l'heure actuelle, ces données semblent indiquer une différence des niveaux d'expression de *Ng2* (ARNm) entre le cortex et la moelle épinière.

### 3.3.2 Établissement d'une liste de gènes candidats en vue d'une caractérisation de la pathologie corticale

Suite à ces premiers résultats, il semble intéressant d'approfondir l'analyse de la pathologie corticale en élargissant le spectre de gènes analysés par une sélection de gènes candidats. Cette sélection a reposé sur une recherche bibliographique de gènes identifiés comme dérégulés dans les mécanismes physiopathologiques associés à la maladie. Plus particulièrement, la sélection s'est portée sur les mécanismes connus de la neuroinflammation, de l'excitotoxicité, du stress oxydatif, du métabolisme mitochondrial, du stress du réticulum endoplasmique, du transport axonal et cytosquelette, du protéasome, de l'autophagie et de la mort cellulaire. Une liste de 60 gènes connus pour être dérégulés au niveau transcriptionnel dans la moelle épinière de patients SLA ou de souris transgéniques modélisant la maladie a été établie. Elle est présentée dans le Tableau 1. Les niveaux d'expression de ces gènes vont maintenant être évalués à partir des ARN extraits du cortex et de la moelle épinière lombaire des souris sauvages ou *Sod1<sup>G86R</sup>*, à 30, 60, 90 et 105 jours par une technique de microfluidique (Fluidigm). Celle-ci permettra de tester la totalité de ces gènes sur tous les échantillons en une seule expérience. Cette étude est en cours.

### 3.3.3 Conclusion

Dans l'ensemble, ces premières données très préliminaires indiquent que le cortex des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* n'est pas le lieu d'une réaction gliale massive telle qu'elle est observée dans la moelle épinière (Figure 2). Ceci suggère que les microenvironnements corticaux et spinaux réagissent de façon différente à la pathologie. De plus, ces résultats laissent supposer qu'au-delà de leurs différences biologiques, les NMCS et les MnBS dégénèrent probablement selon des mécanismes différents et confirment le besoin de mettre en évidence les mécanismes propres à la perte des NMCS au cours de la pathologie. Les différences microenvironnementales vont être étudiées à présent de manière plus détaillée et au fil du temps, en comparant l'expression d'une série de gènes, connus de la littérature pour être dérégulés dans le cortex et la moelle épinière des souris WT et *Sod1<sup>G86R</sup>* au travers d'une approche microfluidique. Par la suite, il est envisagé de compléter ces analyses transcriptionnelles par des validations histologiques de certains marqueurs étudiés en fonction de leur pertinence.

À terme, ces données permettront d'évaluer si les mécanismes extrinsèques qui accompagnent la dégénérescence des NMCS sont différents de ceux jusqu'alors révélés pour les MnBS.

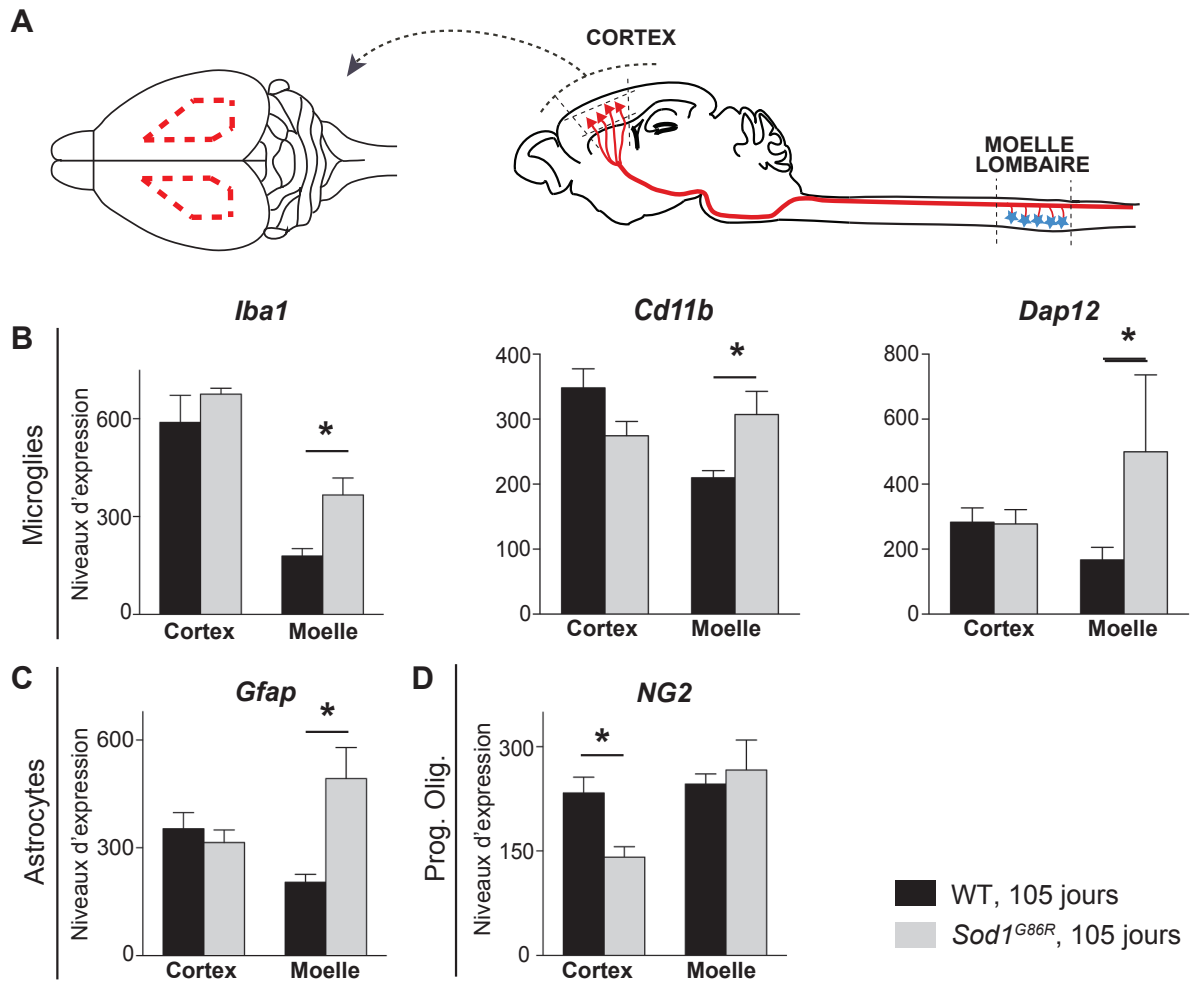


Figure 1. Le cortex des souris *Sod1*<sup>G86R</sup> ne présente pas ou peu de gliose réactionnelle, contrairement à la moelle épinière

**A.** La région corticale sensorimotrice contenant les neurones moteurs cortico-spinaux et la moelle épinière lombaire des souris *Sod1*<sup>G86R</sup> et de leurs contrôles sauvages ont été microdisséquées à 4 âges (30, 60, 90, 105 jours) et analysées par PCR quantitative. **B-D.** Les niveaux d'expression de marqueurs d'activation gliale (*Gfap* pour les astrocytes, *Iba1*, *Cd11b* (ou *Itgam*) et *Dap12* pour les microglies), ainsi que du marqueur de progéniteur d'oligodendrocyte *Ng2* sont représentés pour le cortex et la moelle épinière lombaire de souris *Sod1*<sup>G86R</sup> et de leurs contrôles sauvages à 105 jours.

*Gfap*: Glial fibrillary acidic protein, *Iba1*: Ionized calcium binding adaptor molecule 1, *Cd11b* / *Itgam*: Integrin alpha M, *Dap12*: DNAX activation protein of 12kDa, *NG2*: Neural-glial antigen 2.

Tableau 1 : Gènes dérégulés au niveau transcriptionnel chez les patients SLA et / ou les souris transgéniques modélisant la pathologie.

| Gène                        |   | Régulation   |           | Référence   |
|-----------------------------|---|--|-----------|---|
| Abréviation                 | Nom   | souris <i>SOD1<sup>G93A</sup>*</i>                                 | homme     |   |
| <b>Excitotoxicité</b>       |   |  |           |   |
| <i>Slc1a2 (Glt1, Eaat2)</i> | Solute carrier family 1, member 2           | ↓ ME   | stable Cx | (Philips & Robberecht, 2011; Yang et al., 2009)   |
| <i>Slc17a6 (Vglut2)</i>     | Solute carrier family 17, member 6          | ↑ ME, Cx   | NR        | (De Oliveira, Alves, & Chadi, 2013; Saba et al., 2015)  |
| <i>Gria2 (GluR2)</i>        | Glutamate receptor, ionotropic, AMPA2       | ↑ puis ↓ ME, stable (souris <i>Sod1<sup>G93A</sup></i> )           | ↓ ME, Cx  | (Heath & Shaw, 2002; King, Woodhouse, Kirkcaldie, & Vickers, 2016; Morrison, Janssen, Gordon, & Morrison, 1998; Petri et al., 2005) |
| <i>Gria3 (GluR3)</i>        | Glutamate receptor, ionotropic, AMPA3       | ↑ puis ↓ ME  | NR        | (Petri et al., 2005)  |
| <i>Gria4 (GluR4)</i>        | Glutamate receptor, ionotropic, AMPA4       | ↑ puis ↓ ME  | NR        | (Petri et al., 2005)  |
| <i>Grin1 (NMDAR1)</i>       | Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1       | NR   | ↓ ME      | (Heath & Shaw, 2002; King et al., 2016)   |
| <i>Grin2a (NMDAR2)</i>      | Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A      | NR   | ↓ ME      | (Heath & Shaw, 2002; King et al., 2016)   |
| <i>Slc6a5 (GlyT2)</i>       | Solute carrier family 6 member 5            | ↓ ME   | NR        | (Chang & Martin, 2009)  |
| <i>Glr1</i>                 | Glycine receptor alpha 1                    | ↓ ME   | NR        | (Chang & Martin, 2011; King et al., 2016)   |
| <i>Calb1</i>                | Calbindin                                   | ↓ ME (souris TDP43)<br>Stable (souris <i>Sod1<sup>G93A</sup></i> ) | ↓ ME, Cx  | (Chang & Martin, 2009; King et al., 2016)   |
| <i>Parvalbumin</i>          | Parvalbumin                                 | NR   | ↓ Cx      | (King et al., 2016)   |
| <i>VIP</i>                  | Vasoactive intestinal peptide               | NR   | ↓ Cx      | (King et al., 2016)   |
| <i>Calb2</i>                | Calbindin 2 (Calretinin)                    | ↓ Cx,<br>↓ ME (souris <i>Sod1<sup>G93A</sup></i> )                 | NR        | (King et al., 2016; Morrison et al., 1998)  |
| <i>nNOS</i>                 | Neuronal nitric oxide synthase 1            | NR   | ↑ ME      | (Heath & Shaw, 2002)  |
| <i>Cox-2</i>                | Cyclooxygenase-2                            | ↑ ME   | ↑ ME      | (Heath & Shaw, 2002)  |
| <i>Scn1b</i>                | Sodium voltage-gated channel beta subunit 1 | ↓ ME   | NR        | (King et al., 2016)   |
| <i>Scn2b</i>                | Sodium voltage-gated channel beta subunit 2 | Stable   | NR        | (King et al., 2016)   |
| <i>Scn3b</i>                | Sodium voltage-gated channel beta subunit 3 | ↑ ME   | NR        | (King et al., 2016)   |

| <b>Neuroinflammation</b>                 |   |            |  |
|--|---|------------|--|
| <i>Irgam (Cd11b)</i>                     | Integrin alpha M  | ↑ ME       | (Philips & Robberecht, 2011)   |
| <i>Aif1 (Iba1)</i>                       | Allograft inflammatory factor 1                         | ↑ ME       | (Philips & Robberecht, 2011)   |
| <i>MCP-1</i>                             | Monocyte chemoattractant protein 1                      | ↑ ME       | (Jenny S. Henkel et al., 2004; Jenny S. Henkel, Beers, Siklós, & Appel, 2006)                  |
| <i>Cd11c (ITGAX)</i>                     | Integrin subunit alpha X                                | NR         | (Jenny S. Henkel et al., 2006)   |
| <i>Cd123</i>                             | Cell division cycle 123                                 | NR         | (Jenny S. Henkel et al., 2006)   |
| <b>Stress Oxydatif</b>                   |   |            |  |
| <i>Nrf2</i>                              | Nuclear erythroid 2-related factor 2                    | ↓ ME       | (Sarlette et al., 2008)  |
| <i>Cybb</i>                              | Cytochrome b-245, beta chain                            | NR         | (Wu, Ré, Nagai, Ischiropoulos, & Przedborski, 2006)  |
| <b>Métabolisme mitochondrial</b>         |   |            |  |
| <i>PGC-1alpha</i>                        | Proliferator Y activated receptor-F coactivator 1 alpha | ↓ ME       | (Thau et al., 2012)  |
| <i>NRF-1</i>                             | Nuclear respiratory factor 1                            | ↓ ME, Cx   | (Thau et al., 2012)  |
| <i>NRF-2</i>                             | Nuclear respiratory factor 2                            | ↓ ME, Cx   | (Thau et al., 2012)  |
| <i>Tfam</i>                              | Mitochondrial transcription factor A                    | NR         | (Sarlette et al., 2008; Thau et al., 2012)   |
| <i>mnSOD</i>                             | Manganese superoxide dismutase                          | ↓ ME, Cx   | (Thau et al., 2012)  |
|  |   | ↓ Cx       | (Thau et al., 2012)  |
| <b>Stress du réticulum endoplasmique</b> |   |            |  |
| <i>CHOP</i>                              | C/EBP homologous protein                                | ↑ ME       | (Kieran, Woods, Villunger, Strasser, & Prehn, 2007; Mancuso & Navarro, 2015; Sun et al., 2015) |
| <i>Bim</i>                               | BH3-only protein and a CHOP target gene                 | ↑ ME       | (Kieran et al., 2007)  |
| <i>Puma</i>                              | Puma  | ↑ ME       | (Kieran et al., 2007)  |
|  |   | NR         |  |
|  |   | NR         |  |
| <b>Marqueurs cellulaires</b>             |   |            |  |
| <i>Chat</i>                              | Choline acetyltransferase                               | ↓ ME       | (Dupuis et al., 2000)  |
| <i>Gad2 (Gad 65)</i>                     | Glutamic acid decarboxylase 2                           | ↑ Cx       | (King et al., 2016)  |
| <i>Gad1 (Gad 67)</i>                     | Glutamic acid decarboxylase 1                           | ↑ Cx, ↓ ME | (Hossami et al., 2011)   |
| <i>Gabra1</i>                            | Gamma-aminobutyric acid A receptor, subunit alpha 1     | NR         | (King et al., 2016)  |
|  |   | ↓ Cx       |  |

| <b>Mort cellulaire et cycle cellulaire</b> |   |  |  |
|--|---|--|--|
| <i>Casp 3</i>                              | Caspase 3   | ↑ ME   | NR<br>(Li et al., 2000)  |
| <i>Casp1</i>                               | Caspase 1   | ↑ ME   | NR<br>(Li et al., 2000; Yoshihara et al., 2002)  |
| <i>Bcl-2</i>                               | B-cell lymphoma 2   | ↓ ME   | NR<br>(Vukosavic, Dubois-Dauphin, Romero, & Przedborski, 1999)   |
| <i>Bax</i>                                 | Bcl-2-associated X  | ↑ ME   | NR<br>(Vukosavic et al., 1999)   |
| <i>Bcl-xL</i>                              | BCL2-like protein 1                                       | ↑ ME   | NR<br>(Yoshihara et al., 2002)   |
| <i>c-Fos</i>                               | C-fos proto-oncogene                                      | ↑ ME   | NR<br>(Yoshihara et al., 2002)   |
| <i>JunD1</i>                               | Jun proto-oncogene-related gene                           | ↑ ME   | NR<br>(Yoshihara et al., 2002)   |
| <i>XIAP</i>                                | X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis                | ↓ ME   | NR<br>(Yoshihara et al., 2002)   |
| <i>TNF α</i>                               | Tumor necrosis factor-alpha                               | ↑ ME   | NR<br>(Jenny S. Henkel et al., 2006)   |
| <b>Autophagie et protéasome</b>            |   |  |  |
| <i>Becn1</i>                               | Beclin 1  | ↑ ME, Cx (souris <i>Sod1</i> <sup>G866S</sup> )      | NR<br>(Nassif et al., 2014)  |
| <i>BAG3</i>                                | BCL2 associated athanogene 3                              | ↑ ME   | NR<br>(Crippa et al., 2013)  |
| <i>HSPB8</i>                               | Heat shock protein family B member 8                      | ↑ ME   | NR<br>(Crippa et al., 2010, 2013)  |
| <i>P62/SQSTM1</i>                          | Sequestosome 1  | ↑ ME   | NR<br>(Gal, Strö M, Kilty, Zhang, & Zhu, 2007; Sun et al., 2015)   |
| <i>Edem1</i>                               | ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1 | ↑ ME   | NR<br>(Crippa et al., 2010)  |
| <i>MAP1LC3A</i>                            | Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3        | ↑ ME   | NR<br>(Crippa et al., 2013)  |
| <b>Cytosquelette et transport axonal</b>   |   |  |  |
| <i>NF-L</i>                                | Neurofilament, light subunit                              | NR   | ↓ ME<br>(Heath & Shaw, 2002)   |
| <i>Kif3a</i>                               | Kinesin family member 3A                                  | ↓ ME,<br>↑ ME (souris <i>Sod1</i> <sup>G866S</sup> ) | ↓ Cx<br>(Dupuis et al., 2000; Maximino, De Oliveira, Alves, Chadi, & Hermann, 2014; Pantelidou et al., 2007) |
| <i>Kif3b</i>                               | Kinesin family member 3B                                  | ↑ ME (souris <i>Sod1</i> <sup>G866S</sup> )          | ↓ Cx<br>(Dupuis et al., 2000; Pantelidou et al., 2007)   |
| <i>Kif1a</i>                               | Kinesin family member 1A                                  | ↑ ME (souris <i>Sod1</i> <sup>G866S</sup> )          | Stable<br>(Dupuis et al., 2000; Maximino et al., 2014)   |
| <i>Kif1b</i>                               | Kinesin family member 1B                                  | ↑ ME   | NR<br>(Maximino et al., 2014)  |
| <i>Sema3A</i>                              | Semaphorin 3A   | NR   | ↑ Cx<br>(Körner et al., 2016)  |
| <i>Ocln</i>                                | Ocludin   | NR   | ↓ ME<br>(Henkel et al., 2009)  |

\*les modèles murins différents des souris *SOD1*<sup>G93A</sup> sont indiqués entre parenthèse ; Cx : cortex ; ME : moelle épinière ; NR : non renseigné.

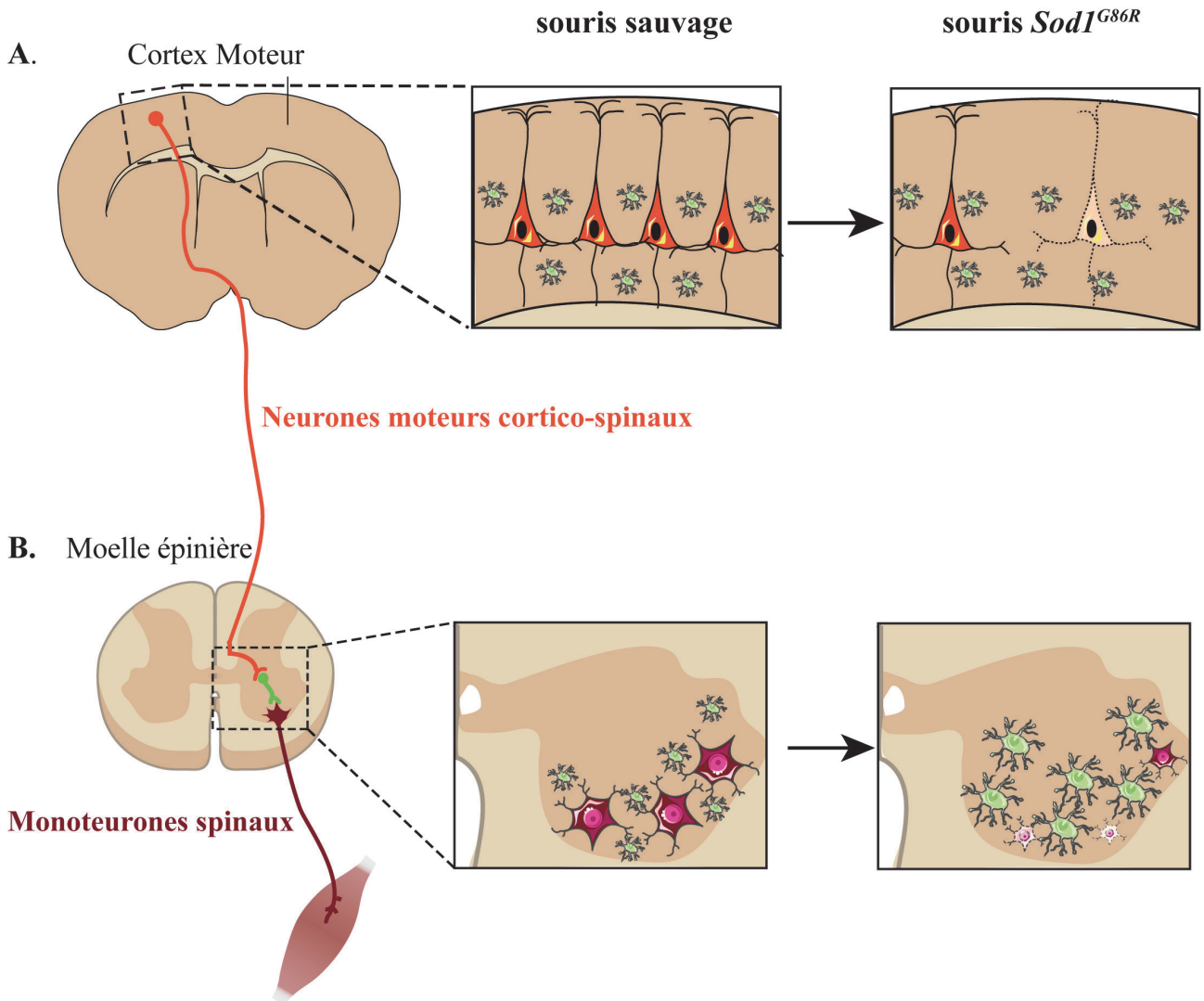


Figure 2. **Caractérisation préliminaire de la pathologie corticale chez les souris *Sod1*<sup>G86R</sup>**

Les résultats préliminaires obtenus indiquent que le cortex des souris *Sod1*<sup>G86R</sup> ne semble pas être le lieu d'une réaction gliale massive (A), contrairement à ce qui est observé dans la moelle épinière (B).



# **DISCUSSION**

Malgré des efforts de recherches intenses et une origine corticale suggérée par de récentes études (Brettschneider et al., 2013; Kassubek et al., 2014; Ling et al., 2013; Robberecht & Philips, 2013; Vucic et al., 2008), on ne sait encore rien de la façon dont dégénèrent les NMCS au cours de la SLA. Pourtant, à l'instar des MnBS, qui ont été largement étudiés, les NMCS sont sélectivement affectés par la maladie. De plus, intermédiaire entre le cortex et la moelle épinière, ils occupent une place centrale dans le circuit moteur et apparaissent ainsi particulièrement pertinents comme initiateurs et/ou propagateurs de la maladie.

La grande densité et hétérogénéité cellulaire du cortex cérébral, associée à un manque d'outils moléculaires et techniques permettant d'identifier des sous-populations corticales spécifiques ont sans doute contribué au manque d'études sur les NMCS en condition de SLA. Par ailleurs, l'émergence de données mettant en avant une atteinte première des terminaisons axonales des MnBS en faveur de l'hypothèse de dégénérescence rétrograde (Fischer et al., 2004), a contribué à faire de la perte des NMCS un aspect secondaire de la pathologie. Rappelons cependant que cette hypothèse repose sur l'observation d'une dégénérescence wallérienne, à l'échelle du neurone (MnS) et non du circuit neuronal moteur. Par conséquent, ces observations ne permettent pas d'affirmer que la perte des MnS se produit avant celle des NMCS et induit leur mort. En effet, le décours temporel de la perte de NMCS n'a jusqu'alors jamais été réalisé parallèlement à celui des MnS.

Depuis la génération des modèles murins *SOD1* (Gurney et al., 1994; Ripps et al., 1995), qui récapitulent de nombreux signes observés chez les patients SLA, ceux-ci (notamment le modèle *SOD1<sup>G93A</sup>*) ont permis l'identification de mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA et sont devenus l'un des principaux outils de criblage de molécules à visée thérapeutique (Drachman et al., 2002; Klivenyi et al., 1999). Cependant, les échecs des essais cliniques ont conduit à une remise en question de la pertinence des modèles murins utilisés (Benatar, 2007), en partie à cause des différences existantes entre l'homme et la souris, et à repenser les recherches précliniques en amont. Néanmoins, s'il est vrai qu'il existe des différences anatomiques (D'Acunzo et al., 2014; Lemon, 2008), ces deux espèces présentent une similarité au niveau cellulaire, notamment neuronale. En effet, leurs processus de développement, de maturation ainsi que leurs propriétés sont semblables. Par ailleurs, il est important de rappeler que la plupart des composés testés, ont été pensés en réponse aux mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'atteinte des MnBS. Ainsi, ces échecs pourraient être le résultat d'un manque d'études portant sur les NMCS dont les mécanismes à l'origine de leur dégénérescence, non encore révélés, pourraient s'avérer pertinents pour le déclenchement de la pathologie. Cela, associé à l'émergence de données récentes en faveur d'un rôle potentiellement initiateur du cortex cérébral (cf. Introduction, IV) amène à reconsidérer le cortex cérébral et les NMCS dans les recherches précliniques menées sur la maladie.

L'orientation des recherches vers la mise en évidence de mécanismes moléculaires responsables de la dégénérescence des NMCS pourrait permettre d'identifier ceux indispensables à leur survie et leur protection et être potentiellement transposables à l'homme. Cependant, les NMCS, contrairement aux MnBS, ne sont pas facilement identifiables. Néanmoins, avec le développement de nouveaux outils il est à présent possible d'envisager l'étude des mécanismes moléculaires responsables de la perte des NMCS, et à plus long terme, de développer de nouvelles approches thérapeutiques. C'est la direction qui a été suivie dans ce projet de recherche.

Cette partie du manuscrit sera consacrée à la discussion du projet de thèse et des résultats des travaux réalisés. La discussion portera en premier lieu sur la dynamique spatio-temporelle de l'atteinte des NMCS puis sur la relation somatotopique des atteintes corticales, spinales et lombaires observée en soulignant l'absence de gliose réactionnelle majeure. De potentiels mécanismes moléculaires responsables de la dégénérescence des NMCS seront ensuite évoqués et discutés, en mettant en avant la découverte de nouveaux acteurs moléculaires identifiés grâce au développement d'une nouvelle approche expérimentale dont l'intérêt sera discuté.

## 1. Dynamique spatio-temporelle de l'atteinte des NMCS

Parmi les modèles murins *SOD1*, seul le modèle murin *SOD1<sup>G93A</sup>* a été validé quant à la dégénérescence des NMCS dans le cadre de la SLA (Leichsenring et al., 2006; Ozdinler et al., 2011; Zang & Cheema, 2002). En outre, même si ces quelques études ont montré une dégénérescence spécifique des NMCS, elles n'ont pas fourni de données concernant la dynamique spatio-temporelle de cette dernière.

C'est pourquoi une partie de mes premiers travaux de recherches a cherché à répondre à deux questions : 1) *Le modèle murin Sod1<sup>G86R</sup> récapitule-t-il la dégénérescence des NMCS observée chez les patients SLA ?* 2) *La dégénérescence des NMCS est-elle homogène le long de l'axe rostro-caudal du cortex cérébral au cours de la maladie ?*

### 1.1 L'atteinte des neurones moteurs cortico-spinaux est progressive

Les souris transgéniques *Sod1<sup>G86R</sup>* (Ripps et al., 1995) développent les premiers symptômes moteurs de manière très homogène et reproductible. Ces souris présentent leurs premiers symptômes au niveau des pattes arrière (altération de la marche), similaire à l'apparition de premiers symptômes moteurs au niveau des jambes des patients porteurs de mutations *SOD1* (Millecamps et al., 2010). Ces symptômes surviennent aux alentours de 90 jours puis évoluent vers une paralysie conduisant à leur mort entre 105 et 110 jours. Néanmoins, bien qu'au niveau

phénotypique ce modèle récapitule les symptômes de la SLA, la perte des NMCS n'a jamais été mise en évidence avant notre étude.

La quantification de la population totale des NMCS, marqués de façon rétrograde grâce à l'injection du traceur FG depuis la région cervicale de la moelle épinière, a montré une perte progressive de cette population chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* au cours de la maladie (cf. publication 1, fig. 1 et fig. suppl. 3). Ainsi, ce modèle murin récapitule une dégénérescence spécifique des NMCS telle qu'elle est observée chez les patients SLA (Hammer et al., 1979; Nihei et al., 1993; Sasaki & Iwata, 1999). Contrairement aux précédentes études menées sur les NMCS (Ozdinler et al., 2011; Zang & Cheema, 2002), une analyse beaucoup plus rigoureuse et détaillée de la population totale de NMCS a ici été réalisée. En effet, cette analyse a porté sur huit coupes espacées à intervalles réguliers le long de l'axe rostro-caudal afin de couvrir la totalité de la région corticale contenant les NMCS. Elle offre ainsi une bonne représentation de la population totale. Du fait du nombre important de coupes à analyser, nous avons développé un comptage automatisé sur le logiciel imageJ (cf. publication 1, fig. suppl. 2). Celui-ci constitue à présent un outil d'analyse très utile pour l'étude de populations corticales à partir de coupes épaisses.

La dégénérescence spécifique des NMCS chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* débute précocement, puisqu'une perte semble se dessiner dès le stade présymptomatique de 60 jours, puis devient significative à 90 jours avec 19% de perte des NMCS marqués. Ceci a également été mis en évidence dans le modèle murin *SOD1<sup>G93A</sup>* par Ozdinler et ses collègues dès l'âge présymptomatique de 60 jours (Ozdinler et al., 2011). Cependant, cette quantification repose uniquement sur trois coupes et est de ce fait moins représentative de la population totale des NMCS. Ces résultats sont en accord avec des études cliniques et des études d'IRM humaines qui indiquent une atteinte des NMCS dans le cortex moteur aux premiers stades de la SLA (Menon, Kiernan, et al., 2015; Vucic & Kiernan, 2006). Si dans notre étude, la perte neuronale au niveau de la population totale de NMCS n'atteint pas un seuil de significativité à 60 jours, cela ne veut pas dire pour autant que la tendance observée n'est pas à l'origine d'un dysfonctionnement cortical dès ces âges là. Il serait donc intéressant de regarder le niveau d'excitabilité cortical chez ces souris. En effet, des études menées chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* ont révélé une hyperexcitabilité très précoce dans ce modèle (Fogarty et al., 2015; Saba et al., 2015).

Chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, la perte des NMCS marqués au FG a été confirmée par une approche histologique d'hybridation *in situ* permettant de révéler l'expression du gène de la mu-crystalline (*Crym*) exprimé par les neurones excitateurs de projection de la couche V du cortex (Arlotta et al., 2005), dont les NMCS. Une diminution progressive du nombre de neurones *Crym*-positifs est observée dans les aires motrices où se situent les NMCS (cf. publication 1, fig. suppl. 3).

Il est important de noter que l'analyse RNA-seq des NMCS purifiés a révélé que l'expression de *Crym* n'est pas altérée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* comparées à leur contrôle sauvage (cf, publication 1, fig. suppl. 6). Ainsi, la diminution progressive des neurones *Crym*-positifs chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* ne résulte pas d'une diminution de l'expression du gène *Crym* (ARNm).

D'autre part, cette diminution indique que la perte des NMCS FG-positifs observée après 5 jours de marquage rétrograde aux quatre âges analysés, n'est pas uniquement le résultat d'une altération du transport rétrograde, mais est également le reflet d'une perte des corps cellulaires. Ceci est soutenu par les travaux de Ozdinler et ses collaborateurs qui ont montré une perte identique des NMCS pour un même âge analysé (120 jours) et deux temps d'injection testés (50 jours et 110 jours) (Ozdinler et al., 2011).

Ainsi, nos résultats, bien que n'excluant pas une possible modification du transport axonal rétrograde, nous permettent néanmoins de conclure à une perte des corps cellulaires des NMCS.

## 1.2 L'atteinte des neurones moteurs cortico-spinaux suit une dynamique spatio-temporelle

Comme énoncé en introduction, la population totale des NMCS est organisée de manière topographique le long des axes rostro-caudal et médio-latéral du cerveau à la fois chez l'homme (Grunbaum & Sherrington, 1901; Leyton & Sherrington, 1917; Penfield & Boldrey, 1937; Penfield & Rasmussen, 1952) et les rongeurs (Akintunde & Buxton, 1992b; Kamiyama et al., 2015; Olivares-Moreno et al., 2017) selon le segment de la moelle épinière qu'elle innerve (Kamiyama et al., 2015; Moreno-López et al., 2016; Olivares-Moreno et al., 2017).

Prenant en considération l'organisation somatotopique des sous-populations des NMCS, nous avons cherché à savoir si la dégénérescence des NMCS observée à l'échelle globale de la population est homogène le long de l'axe rostro-caudal ou s'il existe des sous-populations plus sensibles à la maladie. L'approche de comptage que nous avons développée permet une estimation robuste de la population totale des NMCS le long de cet axe. Elle nous a permis de montrer une perte inégale des NMCS le long de l'axe rostro-caudal : débutant à 90 jours dans les régions les plus caudales puis progressant avec le temps vers les régions les plus rostrales (cf, publication 1, fig. 2). Dans le cortex cérébral de l'homme, la majorité des fibres provenant de la représentation des membres supérieurs se termine au niveau de la moelle épinière cervicale tandis que les fibres issues de la représentation des membres inférieurs se terminent au niveau de la moelle épinière lombosacrée (Schieber, 2007). Chez le rongeur, des études ont montré que les NMCS situés dans les régions caudales (correspondant aux coupes 7, 8 et 9, cf, publication 1, fig. suppl. 4) innervent les membres postérieurs par des projections vers la partie lombaire de la moelle épinière où se situent les MnS innervant les muscles des pattes arrière (Kamiyama et al., 2015; Olivares-Moreno et

al., 2017). En outre, rappelons que les souris *Sod1*<sup>G86R</sup>, tout comme les patients *SOD1* (Millecamps et al., 2010), développent les premiers symptômes moteurs dans les membres inférieurs (Ripps et al., 1995). Ainsi, les données obtenues suggèrent l'existence d'une possible relation somatotopique entre la perte des NMCS dans le cortex, l'atteinte spinale lombaire et des muscles des membres inférieurs.

La progression de la perte observée au cours du temps vers les régions les plus rostrales pourrait être corrélée à la progression des symptômes des membres postérieurs vers les membres antérieurs. En effet, la section 2, qui représente la perte la plus importante au stade final, se situe au niveau de l'aire rostrale des membres antérieurs responsable de leurs mouvements (Bachmann et al., 2014; Tennant et al., 2011). La perte drastique observée au stade final amène à se questionner sur le rôle spécifique de cette population ainsi qu'à envisager à plus long terme une étude plus approfondie de cette dernière. En effet, il serait intéressant d'identifier si cette population est impliquée dans certaines fonctions vitales de l'animal, telle que la respiration volontaire. En effet, chez l'homme, il a été montré que les NMCS contribuent à l'activité des muscles respiratoires lors de la respiration volontaire (Petersen et al., 2011), une fonction altérée chez les patients SLA et provoquant leur mort. Par ailleurs, l'importante perte observée pourrait être le résultat d'une altération de la connectivité provenant des régions caudales premièrement affectées. Ceci serait en accord avec la théorie de propagation corticofuge développée ces dernières années (Brettschneider et al., 2013; Kassubek et al., 2014; Schmidt et al., 2016). En outre, une étude de connectome par IRM chez les patients a montré que la propagation de la maladie serait dépendante de la topologie des réseaux cérébraux (Schmidt et al., 2016). Au niveau des régions sensorimotrices se trouvent des NCP provenant majoritairement de la couche V, et dans une moindre mesure des couches II/III, qui projettent en ipsilatéral vers les régions frontales du cortex moteur (Fame et al., 2011; Mitchell & Macklis, 2005). Dans ces régions se trouve une population de NMCS (coupe 8 et 9, publication 1, fig. suppl. 1), qui dans notre étude, dégénère au cours de la maladie. Dans cet environnement dégénératif, la connectivité locale devenant altérée pourrait entraîner une modification de la connectivité de longue distance pouvant conduire à une propagation de la maladie le long des réseaux anatomiques (Schmidt et al., 2016).

Dans l'ensemble, l'atteinte primaire de sous-populations localisées dans les régions caudales progressant par la suite vers les régions les plus rostrales (atteinte spatiale) au cours du temps (atteinte temporelle) nous a conduit à envisager l'existence d'une possible relation somatotopique des atteintes corticales et spinales que nous avons testée.

## 2. L'atteinte précoce des NMCS à projection lombaire met en avant une relation somatotopique des atteintes corticales, spinales et musculaires

Du fait que les NMCS qui innervent les pattes arrière se situent dans la région caudale du cortex (Kamiyama et al., 2015; Olivares-Moreno et al., 2017), nous avons émis l'hypothèse que la perte initialement observée au niveau des sections les plus caudales correspondrait en majorité à la perte de cette population. La quantification des NMCS à projection lombaire (NMCS<sub>Lomb</sub>) marqués au FG, a révélé une perte progressive, plus précoce (significative dès 60 jours) et plus importante que le reste de la population des NMCS (cf. publication 1, fig. 3), en faveur de cette hypothèse. Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature par Zang et Cheema (2002). En effet, l'injection du FG en T11 de la moelle épinière a montré une perte des NMCS<sub>Lomb</sub> dès l'âge présymptomatique de 60 jours chez les souris *SODI<sup>G93A</sup>GH* (Zang & Cheema, 2002). Oswald et ses collègues (2013) ont montré que les NMCS<sub>Lomb</sub> présentaient des caractéristiques morphologiques distinctes, avec notamment un soma et une arborisation dendritique plus larges par rapport aux NMCS à projection cervicale (Oswald et al., 2013). Ces caractéristiques intrinsèques pourraient conférer aux NMCS<sub>Lomb</sub> une plus grande vulnérabilité et sensibilité aux changements environnementaux.

En accord avec les symptômes observés au niveau des pattes arrière, des études ont montré une atteinte des MnS dans la partie lombaire de la moelle épinière (Dupuis et al., 2000; Morrison et al., 1998; Rouaux et al., 2007). Afin de tester une possible relation somatotopique entre les atteintes corticales, spinales et musculaires, nous avons comparé les dynamiques spatio-temporelles de perte des NMCS à projection lombaire, des MnS lombaires et de la dénervation musculaire chez les souris *SodI<sup>G86R</sup>*. Il a été constaté que la perte des NMCS<sub>Lomb</sub> intervient bien avant celle des MnS lombaires. L'analyse des MnS exprimant la choline acétyltransférase (ChAT) dont la taille supérieure à 400  $\mu\text{m}^2$  est nécessaire pour exclure les motoneurones gamma plus petits et non affectés dans la maladie, n'a montré qu'une perte significative au stade final de la maladie (65,27%,  $p < 0,001$ ). Les données de la littérature rapportent également une perte très tardive, à 105 jours, de cette population neuronale chez les souris *SodI<sup>G86R</sup>* (Dupuis et al., 2000; Halter et al., 2010; Morrison et al., 1998; Rouaux et al., 2007). De manière intéressante, dans une autre étude menée par Dupuis et ses collègues (2004) où l'analyse des motoneurones a été effectuée selon trois intervalles de taille (300  $\mu\text{m}^2$ , entre 300  $\mu\text{m}^2$  et 600  $\mu\text{m}^2$ , et supérieur à 600  $\mu\text{m}^2$ ), une perte des motoneurones ayant une taille supérieure à 300  $\mu\text{m}^2$  est observée tandis que le nombre de motoneurones inférieurs à cette taille se retrouve augmenté à 90 jours (Dupuis et al., 2004). Ainsi,

ces données associées aux nôtres suggèrent que la dégénérescence des MnS lombaires survient tardivement au cours de la maladie, et que l'atteinte de cette population entraînerait une atrophie cellulaire plus qu'une perte massive des corps cellulaires. De plus, les enregistrements électromyographiques et l'analyse histologique des JNM ont montré une dénervation à partir de 90 jours (17,7% de JNM totalement dénervées à 90 jours et 76,9% au stade final) chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (cf. publication 1, fig. suppl. 5) en accord avec de précédentes études (Dupuis et al., 2002; Jokic et al., 2006). Ces résultats indiquent par conséquent que l'atteinte des MnS, que ce soit au niveau du corps cellulaire ou de leur terminaison axonale, n'est observable qu'après la perte des NMCS<sub>Lomb</sub>.

Pris dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que la perte des NMCS<sub>Lomb</sub> intervient bien avant l'atteinte de la population totale des NMCS, l'atteinte des MnS lombaires, et l'apparition des symptômes moteurs. Ceci suggère que ce modèle murin récapitule la relation somatotopique entre les régions corporelles affectées (membres postérieurs) et les zones corticales altérées (régions caudales). De plus, ces données sont d'autant plus pertinentes qu'elles reflètent la relation somatotopique décrite par un petit nombre d'études menées chez les patients SLA (Menon et al., 2017; Mochizuki et al., 1995; Ravits & La Spada, 2009; Zhang, Mao, et al., 2014). Ainsi, des travaux menés par Zhang et ses collaborateurs ont montré l'existence d'une latéralisation de l'atteinte entre le site d'apparition des symptômes et la région corticale atrophiée, en accord avec nos observations. Leurs résultats suggèrent que le site d'apparition des symptômes peut prédire l'atteinte corticale chez les patients SLA et que la progression de la maladie est corrélée avec l'étendue de l'atteinte corticale (Zhang, Mao, et al., 2014).

En dépit des critiques adressées aux modèles murins, notamment en raison des différences qui existent au niveau de l'organisation du TCS avec l'homme (Eisen et al., 2017; Lemon, 2008), nous avons pu observer des similarités avec les patients SLA au niveau de la perte des NMCS et de la relation somatotopique des atteintes (Hammer et al., 1979; Mochizuki et al., 1995; Nihei et al., 1993; Ravits & La Spada, 2009; Sasaki & Iwata, 1999; Zhang, Mao, et al., 2014). De ce fait, le modèle murin utilisé semble être pertinent pour l'étude de la maladie. Par ailleurs, contrairement aux modèles de primates plus proches de l'homme, ils offrent un éventail d'applications comme notamment la purification des NMCS.

L'origine corticale suggérée par de récentes études amène à reconsidérer l'hypothèse antérograde de dégénérescence émise par Jean-Martin Charcot (Braak et al., 2017; Brettschneider et al., 2013; Kassubek et al., 2014). Les NMCS, servant de relai entre le cortex et la moelle épinière, pourraient être à l'origine de la transmission de la pathologie vers les MnS de la moelle épinière. Toutefois, le mode de transmission reste une question ouverte. Différentes théories existent. Tout



## DISCUSSION

d'abord, les observations cliniques chez les patients SLA montrent que l'extension des symptômes ne se produit pas au hasard. Les symptômes se propagent généralement vers des régions contiguës, d'une région à l'autre, ou d'un côté du corps vers le côté controlatéral. Sur la base des signes cliniques, du site d'apparition de la maladie et d'analyses post-mortem de la moelle épinière, Ravits et ses collègues (2007), ont suggéré que la perte des neurones est un processus focal qui se propage de façon contiguë au cours du temps en suivant l'anatomie en trois dimensions des NMCS et des MnBS (Ravits et al., 2007). Deux types de mécanismes de propagation seraient impliqués : une propagation contiguë qui se produit de cellule à cellule localement à travers la matrice extracellulaire indépendamment des connexions neuro-anatomiques et une propagation par le réseau qui dépend des connexions synaptiques et de la transmission axonale. En suivant l'hypothèse de Ravits, il serait possible d'envisager, une atteinte initiale au niveau des régions caudales du cortex entraînant une atteinte des MnS lombaires vers lesquels ils connectent. L'atteinte se propagerait d'abord de cellule à cellule vers le membre controlatéral, avec une diffusion horizontale de courte distance conduisant à une atteinte bilatérale des pattes arrière. En effet, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* présentent une asymétrie de l'atteinte des pattes à l'apparition des symptômes. Une propagation de la pathologie des régions caudales du cerveau vers les régions rostrales s'effectuerait au cours de la pathologie, suivant le même schéma au niveau de la moelle épinière.

Par ailleurs, il est également possible que le bon fonctionnement et la survie des MnS requièrent un certain nombre de NMCS fonctionnels. Nous avons montré une perte des NMCS<sub>Lomb</sub> chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* bien avant l'apparition des symptômes moteurs (cf. publication 1, fig. 3 et figure suppl. 5). Comme décrit en introduction, un NMCS peut innervé plusieurs MnS (divergence) (Datta & Stephens, 1990; McKiernan et al., 1998), et chaque MnS est innervé par plusieurs NMCS (convergence) (Kwan et al., 1978; Penfield & Boldrey, 1937). Ainsi, il est possible que la dégénérescence d'un NMCS affecte plusieurs MnS, mais seulement légèrement au début de la maladie puisque d'autres NMCS encore présents et innervant également ces MnS pourraient compenser cette perte. La dégénérescence des MnS n'aurait alors lieu que lorsqu'il n'y aurait plus suffisamment de NMCS (seuil atteint à environ 37% de perte) pour moduler leur activité. Il serait donc particulièrement intéressant de tester la réponse des MnS à une mort sélective des NMCS induite expérimentalement.

Dans l'ensemble, ces données indiquent que, chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, la dégénérescence des NMCS se produit de manière somatotopique, avec une atteinte plus précoce et plus importante des NMCS à projection lombaire. En outre, nos données indiquent que la perte de NMCS survient avant l'apparition des premiers signes d'atteinte des MnS, suggérant qu'au cours de la SLA, la neurodégénérescence pourrait suivre une progression descendante, du cortex cérébral vers la moelle

épineière et les muscles. Compte tenu de ces résultats, il nous a paru pertinent d'entreprendre une caractérisation plus précise des mécanismes extrinsèques (environnement cortical) et intrinsèques (mécanismes moléculaires) associés à cette dégénérescence. Pour cela nous avons cherché à répondre à deux grandes questions : 1) *Dans quel environnement cette dégénérescence prend-elle place ?* 2) *Quels sont les mécanismes moléculaires intrinsèques sous-tendant le dysfonctionnement initial et la perte ultime des NMCS ?*

### 3. La dégénérescence des NMCS semble se produire en l'absence de gliose majeure

Contrairement à la pathologie spinale aujourd'hui bien décrite, on sait encore très peu de la pathologie corticale dans les modèles murins de SLA. L'analyse préliminaire de l'état de réactivité gliale chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* a révélé que la dégénérescence des NMCS bien qu'atteignant 33% au stade final de la maladie ne semble pas s'accompagner d'une gliose réactionnelle massive telle qu'elle a pu être observée au niveau de la moelle épinière (Levine et al., 1999; Morrison et al., 1998). Bien que nos données soient très préliminaires, car elles ont porté sur un seul âge symptomatique de 105 jours et un petit nombre de gènes, plusieurs hypothèses peuvent néanmoins être formulées pour expliquer cette absence d'activation gliale dans le cortex cérébral des souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. En effet, des études portant elles aussi sur la comparaison de l'état d'immunoréactivité gliale entre le cerveau et la moelle épinière de modèles de rongeurs *SOD1<sup>G93A</sup>* rapportent une implication bien plus prépondérante des astrocytes et des microglies dans la pathologie spinale que dans la pathologie corticale (Fendrick et al., 2007; Nikodemova et al., 2014; Yang et al., 2011).

Ces données, en accord avec nos résultats, pourraient révéler une incapacité des cellules gliales à produire une réponse au niveau cortical au stade final étudié. Cette incapacité pourrait s'expliquer par une hyposensibilité des cellules gliales corticales aux signaux inflammatoires libérés par les NMCS en dégénérescence, comme le suggèrent Nikodemova et ses collaborateurs (Nikodemova et al., 2014). Selon leurs études, les microglies spinales seraient plus sensibles à ces signaux. Ainsi, elles s'activeraient plus précocement et de façon plus importante, permettant une détection par qPCR. Un enrichissement en gènes impliqués dans la neuroinflammation et l'immunité est ressorti de nos analyses RNA-seq à 105 jours uniquement. Il est par conséquent possible que les cellules gliales soient insensibles à ces signaux ou que ces derniers soient délivrés trop tardivement pour induire une réaction gliale suffisante. Les expériences visant à caractériser l'état d'activation gliale à des stades plus précoces de la maladie et avec un plus grand nombre de gènes (30, 60 et 90 jours) permettront de tester cette hypothèse.

Par ailleurs, il a été observé dans le cortex moteur de patients la présence de petites plaques astrocytaires dispersées (Nagy et al., 1994). De plus, il a été observé une microgliose à proximité des NMCS chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Jara et al., 2012). Ainsi, il est également possible d'envisager l'existence d'une gliose corticale à des stades tardifs dans le modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>*, mais non quantifiable par qPCR, du fait de l'hétérogénéité tissulaire. En effet, les changements d'expression des gènes qui se produisent dans ces cellules gliales pourraient ne pas être détectés, car ils ne contribuent qu'à une fraction minime de l'ARN total extrait du cortex moteur microdisséqué. Des analyses histologiques des tissus aux différents âges étudiés vont être réalisées et permettront, en association avec les données transcriptionnelles, une meilleure caractérisation de l'état de réactivité gliale corticale au cours de la maladie.

D'autre part, les données de la littérature ont reporté une augmentation de la prolifération et de la différenciation des précurseurs oligodendrocytaires NG2+ associée à une augmentation des niveaux protéiques NG2+, un mécanisme compensatoire visant à maintenir un nombre constant d'oligodendrocytes (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Il est possible d'envisager que la diminution du niveau d'expression du gène *Ng2* dans le cortex cérébral des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* à 105 jours puisse résulter d'une augmentation de la machinerie traductionnelle, expliquant de ce fait l'augmentation protéique de NG2+ observée (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Des études immunohistologiques vont être réalisées afin de tester cette hypothèse.

Enfin, bien que trop préliminaires pour être interprétées à l'heure actuelle, ces données semblent indiquer une différence des niveaux d'expression de *Ng2* entre le cortex et la moelle épinière. De manière intéressante, il a été rapporté dans d'autres maladies neurodégénératives qu'un contexte de mort cellulaire pouvait ou non induire une réponse NG2+. Ainsi, il semblerait que la mort neuronale seule ne soit pas suffisante pour déclencher cette réponse, cette dernière pourrait être davantage liée au microenvironnement (Dimou & Gallo, 2015). D'après les résultats précédents, la différence de microenvironnement observée entre le cortex et la moelle épinière pourrait expliquer la différence de réponse NG2+ entre ces deux régions.

Dans l'ensemble, bien que les données actuelles obtenues soient encore très préliminaires, elles suggèrent néanmoins que les MnS et les NMCS semblent dégénérer dans un environnement pathologique différent. De plus, les NMCS et les MnBS sont de nature très différente : les NMCS sont glutamatergiques et connectent des neurones, alors que les MnS sont cholinergiques et connectent des muscles (Purves et al., 2011). De plus, ces deux populations neuronales sont situées dans des régions distinctes et ont une histoire développementale différente. Cela laisse également supposer que si ces neurones dégénèrent dans des microenvironnements différents, il est alors

possible que la dégénérescence de ces deux populations se fasse selon des mécanismes qui sont propres à chaque population. Étant donné que les nombreuses études précliniques portant sur les mécanismes de dégénérescence des MnBS n'aient pas abouti à des stratégies thérapeutiques efficaces, il apparaît nécessaire d'étudier plus précisément la façon dont meurent les NMCS au cours de la maladie.

## 4. L'analyse transcriptomique des NMCS met en évidence de nouveaux acteurs moléculaires pertinents dans la sclérose latérale amyotrophique

Notre étude a permis de mettre en évidence des dérégulations transcriptionnelles spécifiques aux NMCS, détectables dès les âges présymptomatiques de la maladie et s'amplifiant aux stades symptomatiques, pour conduire notamment à un enrichissement des gènes impliqués dans les processus de survie et de mort, ou encore de réponse immunitaire.

### 4.1 Stratégie expérimentale

Les techniques de transcriptomique sont de puissants outils pour les études moléculaires. Elles ont largement contribué à la mise en évidence des voies moléculaires impliquées dans la physiopathologie des MnS (Caballero-Hernandez et al., 2016; Ferraiuolo et al., 2011; Heath et al., 2013). Parmi les technologies de transcriptomique développées, le séquençage des ARN (RNA-seq) est l'approche qui fournit la mesure la plus précise des niveaux de transcrits (Wang et al., 2009). De ce fait, le RNA-seq a été utilisé pour la mise en évidence des altérations transcriptomiques qui prennent place lors de la dégénérescence des NMCS chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*.

Pour permettre cette analyse, nous avons développé une méthode de purification des NMCS ainsi que des NCP des couches corticales II/III, en qualité de contrôle depuis le cortex cérébral des mêmes souris adultes sauvages ou *Sod1<sup>G86R</sup>* (cf. publication 1, fig. 4 et fig. suppl. 6). Les NCP et les NMCS sont des populations neuronales proches qui partagent de nombreuses caractéristiques : elles proviennent d'un même groupe de progéniteurs corticaux, sont des neurones excitateurs à longue projection (axones longs), utilisent le glutamate comme neurotransmetteur et expriment des marqueurs moléculaires communs. Néanmoins, par opposition aux NMCS, les NCP ne dégèrent pas dans la SLA, chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* et les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (Ozdinler et al., 2011). À ma connaissance, la purification par FACS de neurones corticaux de projection à partir d'un cerveau de souris adulte n'a jamais été publiée jusqu'à aujourd'hui. La nouveauté et les apports scientifiques potentiels de ce protocole seront discutés en dernière partie.

La comparaison des profils d'expression de ces deux populations neuronales nous permet de distinguer les gènes uniquement dérégulés dans les NMCS et susceptibles d'être impliqués dans leur dégénérescence, des gènes dérégulés dans les deux populations neuronales et qui pourraient ne pas jouer un rôle dans la perte neuronale. En effet, les NCP ne dégèrent pas dans la maladie (Ozdinler et al., 2011). Dans le cadre de notre étude, l'utilisation des NMCS purifiés est indispensable pour l'analyse transcriptomique précise de cette population. Concernant la population contrôle, il aurait été possible d'envisager l'utilisation du tissu entier, tel que l'intégralité du cortex cérébral ou des aires corticales motrices. Ce type d'analyse a déjà été réalisé dans le cadre d'une étude portant sur la mise en évidence de gènes dérégulés uniquement dans les MnS et non dans la moelle épinière de patients SLA (Jiang et al., 2005). Néanmoins, notre choix s'est porté vers les NCP pour plusieurs raisons en plus de celles évoquées précédemment. La première raison est une limite technique : en effet, collecter la totalité des aires motrices du cortex rendrait trop difficile la purification des NMCS marqués, le processus de tri serait trop long et pourrait conduire à un rendement bien trop faible de neurones. De plus, le marquage des NMCS requiert une procédure chirurgicale, il est par conséquent possible que certains NMCS ne soient pas marqués par cette technique et puissent être intégrés dans la population contrôle, faussant ainsi les analyses. D'autre part, le cortex présente une grande hétérogénéité cellulaire et il a été rapporté dans la SLA que d'autres populations cellulaires sont affectées dans le cortex comme par exemple les interneurons exprimant la PV (Nihei et al., 1993), d'autres populations non connues pourraient également être affectées. Ainsi, il n'est pas exclu que ces populations puissent partager des mécanismes moléculaires pertinents : les intégrer dans la population contrôle pourrait conduire à l'exclusion de gènes potentiellement intéressants.

#### **4.2 Les données de séquençage révèlent une augmentation des altérations transcriptomiques au cours de la dégénérescence des NMCS**

L'analyse des gènes dérégulés, selon des stratégies établies, devrait permettre d'identifier des gènes pertinents pour la mise en place du dysfonctionnement et/ou de la perte des NMCS. Ces derniers constitueraient de véritables « candidats » pour le développement d'approches thérapeutiques.

Des paramètres statistiques restrictifs (valeur  $p$  ajustée  $< 0,05$  et  $\text{Log}_2\text{FC} > 111$ ) ont été appliqués aux 4 âges étudiés afin de ne conserver que les gènes qui sont dérégulés de manière robuste et qui pourraient donc jouer un rôle important dans la perte des NMCS. Des paramètres statistiques restrictifs similaires (valeur  $p$  ajustée  $\leq 0,05$  et  $\text{FC} > 2$ ) ont été appliqués, par Andres-Benito et ses collaborateurs, pour mettre en évidence des altérations transcriptionnelles dans le cortex préfrontal et la moelle épinière de patients SLA et procéder à une validation par qPCR

(Andrés-Benito et al., 2017). En effet, l'application de critères statistiques peu restrictifs, bien qu'intéressante, conduirait à l'identification de faibles variations transcriptionnelles qui pourraient ne pas être détectables par qPCR ou par hybridation *in situ*. Or de telles techniques sont communément utilisées pour la validation des gènes sélectionnés avant de procéder à une validation sur tissus humains.

Cette stratégie de sélection a permis la mise en évidence de dérégulations transcriptomiques dès les âges présymptomatiques, 30 et 60 jours (cf. publication 1, fig. 4c), avant même une perte visible des NMCS indiquant la mise en place d'altérations très précoces (cf. publication 1, fig. 1). Une augmentation progressive du nombre de gènes dérégulés est observée au cours de la maladie, avec un pic à 90 jours, qui est l'âge à partir duquel on observe une perte significative de la population totale des NMCS (cf. publication 1, fig. 1). Ceci reflète une cascade d'altérations transcriptionnelles qui prendrait place en réponse à la dégénérescence des NMCS, qu'il s'agisse de mécanismes de défense ou de mort cellulaire. Le nombre plus faible de gènes dérégulés observé à 105 jours pourrait s'expliquer par le fait qu'à ce stade très avancé de la maladie, les NMCS sont très vulnérables et très altérés, et par conséquent plus difficiles à maintenir intègre le long du processus de purification. Il est en effet possible que les NMCS les plus affectés n'aient pas tous résisté à la purification, tels que, par exemple, des NMCS des régions caudales du cortex, ne permettant d'analyser qu'une plus faible proportion d'entre eux. Une autre possibilité est que contrairement aux âges antérieurs où une série de mécanismes s'active, par exemple en réponse à la SOD1 mutée et pour la survie neuronale, il est probable qu'à 105 jours, certains de ces mécanismes s'éteignent tels que les processus métaboliques identifiés comme enrichis à 90 jours et absents à 105 jours (cf. publication 1, fig. 4d).

En revanche, la population contrôle des NCP présente un nombre de gènes dérégulés relativement faible et constant au cours de la maladie (cf. publication 1, fig. 4c). De plus, peu de gènes communs dérégulés ont été retrouvés entre ces deux populations. Ceci est en accord avec l'absence de dégénérescence de cette population neuronale au cours de la maladie et suggère que cette population, contrairement aux NMCS, est moins sensible à la surexpression de la protéine SOD1 mutée.

Dans l'ensemble, ces données montrent des dérégulations significatives de l'expression des gènes dans les NMCS dès l'âge présymptomatique de 30 jours. Elles deviennent beaucoup plus nombreuses à 90 jours lorsque la dégénérescence devient détectable au niveau de la population totale de NMCS et restent importantes à 105 jours.

Parallèlement, une étude d'enrichissement a permis de déterminer des catégories de gènes plus ou moins représentées dans les données de séquençage qu'elles ne le sont au sein du génome entier. Cela a permis d'avoir une vue d'ensemble des principaux mécanismes altérés dans les NMCS. Étant donné le nombre relativement faible de gènes statistiquement dérégulés aux âges présymptomatiques, l'analyse d'enrichissement n'a pu être réalisée qu'aux âges symptomatiques (cf. publication 1, fig. 4c). Les processus biologiques enrichis ont été recherchés afin de ne mettre en évidence que ceux qui sont les plus dérégulés et qui pourraient donc jouer un rôle important dans le dysfonctionnement et la dégénérescence des NMCS. À 90 jours, seule la catégorie « processus métabolique » est obtenue. L'analyse des composants cellulaires montre que cette dérégulation des processus métaboliques touche l'ensemble de la cellule (cytoplasme, organelles, RE) (données non montrées). À 105 jours, les gènes identifiés comme enrichis sont essentiellement impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation, mais également dans les processus développementaux. Les réponses immunitaires et inflammatoires enrichies sont en accord avec les données d'une analyse transcriptomique post-mortem réalisée à partir de cortex moteur de patients SLA (Lederer et al., 2007). Cependant, ces analyses post-mortem ne permettent pas d'établir à quel moment ces réponses se mettent en place dans le cerveau des patients. Chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* en revanche, ces fonctions biologiques n'apparaissent pas dans les résultats d'enrichissement à 90 jours, et il se pourrait donc qu'elles soient, au niveau du cortex cérébral, très tardives. Une astroglie et une microglie tardives ont été décrites à proximité des NMCS (Ozdinler et al., 2011). Par conséquent, les réponses immunitaires et inflammatoires enrichies, tardivement identifiées dans nos analyses, pourraient être à l'origine de cette gliose locale observée, et expliquer l'absence de détection d'une gliose réactionnelle massive même à un stade avancé dans nos résultats de qPCR.

D'autre part, la catégorie « processus développementaux » suggère que de potentiels mécanismes régénératifs pourraient prendre place au sein des NMCS affectés. L'analyse poussée des gènes de ces catégories, et de leurs profils d'expression, pourrait permettre d'envisager de manipuler les voies de signalisations correspondantes pour tenter de renforcer ces tentatives de régénération endogènes, afin de protéger plus efficacement les NMCS. De plus, les processus de régénération ne sont pas spécifiques aux NMCS puisqu'il a été montré qu'ils opèrent également dans la moelle épinière (Chi et al., 2006). Ainsi, l'identification de gènes communs permet d'envisager la protection combinée de ces deux populations neuronales.

Dans leur globalité, ces données suggèrent que les processus dégénératifs activés dans les NMCS induiraient des réponses immunitaires et neuroinflammatoires tardives ainsi qu'une réactivation des processus développementaux.

### 4.3 L'analyse RNA-seq révèle différents profils d'expressions géniques

Si l'analyse d'enrichissement permet de rendre compte des grandes fonctions biologiques et cellulaires mises en jeu lors de la perte des NMCS, une analyse plus détaillée des profils géniques est nécessaire pour l'identification de gènes candidats (cf. publication 1, fig. 5 et 6). Une analyse temporelle des profils d'expression des gènes significativement dérégulés est particulièrement pertinente pour ce processus de sélection. Elle permet, d'une part, d'écarter des gènes dont l'expression est faible et fluctuante et, d'autre part, de conserver des gènes dont l'expression est considérablement modifiée en comparaison des NCP. Un ensemble de gènes a été retrouvé surexprimé de façon constante à tous les âges parmi lequel se trouvent des gènes impliqués dans la croissance cellulaire, le développement, la morphogénèse, la réparation tissulaire (*Emb*, *Fgf9*, *Tekt5*), la survie (*Parm1*) ou le métabolisme (*Gmpr*, *Nrip3*) (cf. publication 1, fig. 6). Ce profil pourrait ainsi refléter une réaction cellulaire maintenue dans le temps en réponse à la présence d'une protéine mutée. Cette réponse se traduirait par l'activation de voies de signalisation impliquées dans la survie en réponse à des altérations métaboliques. Parallèlement, il a été observé un ensemble de gènes dont l'expression, augmentée dès 30 jours, continue de s'accroître au cours du temps (cf. publication 1, fig. 6). Parmi eux se trouvent des gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire (*Adamts15*), la régulation de canaux (*Lhfpl5*) ou encore impliqués dans l'autophagie (*Tmem74*) (cf. publication 1, fig. 6). Ces altérations pourraient refléter une atteinte du fonctionnement cellulaire et la mise en place d'une altération morphologique, telle que l'atteinte précoce des dendritiques apicales décrite dans la littérature (Fogarty et al., 2015, 2016; Jara et al., 2012; Saba et al., 2015). En outre, des gènes impliqués dans le mécanisme de l'autophagie ont également été identifiés dans le cortex frontal et la moelle épinière des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (Nassif et al., 2014). Le gène *Lhfpl5* est un régulateur de canaux ioniques K<sup>+</sup> de mécanotransduction connu pour être exprimé dans les cellules ciliées de l'oreille interne (Xiong et al., 2012). Sa surexpression pourrait être associée à l'hyperexcitabilité corticale décrite dans la littérature (Blair et al., 2010; Menon et al., 2017; Menon, Kiernan, et al., 2015; Shibuya et al., 2017; Vucic et al., 2008; Vucic & Kiernan, 2006). En effet, l'augmentation de *Lhfpl5* dans les NMCS pourrait entraîner un changement de l'équilibre Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> dans la cellule, avec une entrée plus importante de K<sup>+</sup> conduisant à une augmentation sa concentration en intracellulaire. L'ouverture des canaux K<sup>+</sup> voltage dépendants, lors d'un potentiel d'action, pourrait alors conduire à une sortie massive et plus rapide des ions K<sup>+</sup> du fait du fort gradient de concentration. La phase de repolarisation qui serait alors plus rapide conduirait à l'établissement plus rapide d'un second potentiel d'action. Ainsi, ces dérégulations précoces de plus faible ampleur aux âges présymptomatiques et progressant avec la



maladie pourraient jouer un rôle important dans le fonctionnement des NMCS aux âges symptomatiques.

Enfin, il est également observé des gènes dont l'expression augmentée, diminue avec le temps. Parmi eux, se trouvent par exemple des gènes impliqués dans la régénération et le développement (*Postn*) ou dans le transport et le métabolisme de la vitamine B12 (*Amn*). La vitamine B12, qui ne peut être obtenue que par l'alimentation, est impliquée dans la production énergétique et le métabolisme des lipides. Rappelons que la SLA se caractérise par une altération du métabolisme lipidique (Cutler et al., 2002; Henriques et al., 2015; Palamiuc et al., 2015). Ainsi, ce profil d'expression génique pourrait traduire un mécanisme initial de compensation en réponse à des altérations cellulaires qui s'épuiserait avec la progression de la maladie. Dans le cas du gène *Amn* (*Amnion Associated Transmembrane Protein*), cela résulterait en une diminution de son expression entraînant une diminution de l'entrée de la vitamine B12 dans la cellule ainsi qu'une altération du métabolisme lipidique. Par ailleurs, la diminution de l'expression de gènes impliqués dans de telles voies comme celles de la régénération ou le transport de métabolites importants pour le bon fonctionnement cellulaire pourrait contribuer à la perte des NMCS.

Concernant les gènes sous-exprimés, nous avons essentiellement identifié des gènes dont l'expression est diminuée de manière constante au cours de la maladie. Parmi eux se trouvent des gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette (*Fnbp11*), dans le métabolisme des héparanes sulfates et l'absorption lipidique (*Ndst3*) ou encore dans la plasticité neuronale (*Prss12*). L'altération de ces gènes montre ici encore des signes d'une atteinte métabolique, morphologique et de connectivité des NMCS en dégénérescence.

La plupart des gènes candidats sélectionnés sur la base de leur profil d'expression, de leur pertinence fonctionnelle et des données de la littérature n'ont encore jamais fait l'objet de recherches dans le contexte de SLA. De ce fait, ils pourraient apporter de nouvelles connaissances sur la maladie et notamment sur les mécanismes de dégénérescence des NMCS et potentiellement le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ainsi, les gènes *Ndst3* et *Fnbp11* sont de bons exemples de gènes présentant un profil pertinent et dont les données de la littérature suggèrent qu'ils pourraient avoir un rôle important dans la maladie. Le gène *Fnbp11* (*Formin binding protein 1-like*), encode une protéine qui interagit avec des RhoGTPases telle Cdc42 qui module le cytosquelette d'actine et joue un rôle dans le transport axonal et la formation des épines dendritiques (Govek et al., 2005). Ainsi, il est possible que la diminution de l'expression de *Fnbp11*, révélée par RNA-seq dans les NMCS des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* aux 4 âges, entraîne une diminution de son interaction avec Cdc42 et par conséquent perturbe l'organisation du cytosquelette. L'altération de l'expression de *Fnbp11* dans les NMCS

pourrait contribuer à l'altération des épines dendritiques des NMCS qui ont été mises en évidence dans les modèles murins *SOD1<sup>G93A</sup>* (Fogarty et al., 2015, 2016; Jara et al., 2012; Nihei et al., 1993; Saba et al., 2015) ainsi qu'à une altération du transport axonal. Par ailleurs, Lederer et ses collaborateurs ont également mis en évidence, dans le cortex moteur de patients SLA, des altérations transcriptionnelles de gènes codant pour des composants du cytosquelette (Lederer et al., 2007). Cela suggère que l'altération du cytosquelette pourrait effectivement être un élément important de la pathologie qui caractérise les NMCS en condition de SLA comme cela a été décrit pour les MnS (Introduction, II.4.6) (Al-Chalabi et al., 1999; Corbo & Hays, 1992; Corrado et al., 2011). De manière intéressante, des mutations du gène *ALS2 (Alsin Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor)* codant pour la protéine Alsine, un autre partenaire de Cdc42, sont à l'origine de cas familiaux de SLA (Govek et al., 2005), mais également de cas de SLP (Yang et al., 2001). D'autre part, il a été montré que la protéine FBNP1L a un rôle dans l'autophagie (Huett et al., 2009). La baisse de l'expression du gène *Fbnp1l* dans les NMCS des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* pourrait affecter le processus d'autophagie favorisant ainsi la mise en place d'un environnement toxique pour les NMCS participant ainsi à leur perte. Enfin, il a été montré que le gène *C9ORF72*, identifié dans la majorité des cas de SLA familiale (40%) (Corrado et al., 2011; DeJesus-Hernandez et al., 2011; Majounie et al., 2012; Renton et al., 2011) joue également un rôle dans l'autophagie (Ciura et al., 2016) suggérant bien que ce mécanisme prend une place importante dans la maladie.

Concernant le gène *Ndst3 (N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 3)*, il se trouve significativement diminué dans les NMCS des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* comparativement aux souris sauvages. En outre, il existe à la surface des héparans sulfates qui composent la matrice extracellulaire, des sites de liaison aux lipides dont la spécificité est définie par des modifications chimiques catalysées par l'enzyme Ndst3. Ces héparans sulfates sont impliqués dans le métabolisme lipidique et notamment l'absorption des lipides. Plus précisément, ces derniers facilitent le transport des acides gras à travers la membrane plasmique des adipocytes, contribuant ainsi à l'accumulation intracellulaire de lipides (Bishop et al., 2008; Kolset & Salmivirta, 1999). Ainsi, la baisse d'expression de *Ndst3* pourrait être à l'origine d'un appauvrissement des NMCS en acides gras et contribuer à l'altération du métabolisme lipidique qui caractérise les patients SLA (hypermétabolisme) (Dupuis et al., 2004). Un régime alimentaire riche en lipides a montré un effet bénéfique sur la survie des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et des patients SLA, et montre l'importance des lipides dans la maladie (Dupuis et al., 2004; Wills et al., 2014). Il est ainsi possible d'envisager que la modification d'expression du gène *Ndst3* observée dans les NMCS pourrait jouer un rôle dans la perte des NMCS en altérant l'absorption lipidique.

Dans l'ensemble, l'analyse des données de RNA-seq a permis d'identifier différents profils de gènes altérés. Ces modifications d'expression pourraient être le reflet d'une réponse cellulaire à la présence de la protéine SOD1 mutée, d'une diminution de la survie, de la mise en place de mécanismes de dégénérescence des NMCS, ou encore des tentatives potentielles des NMCS pour pallier à la dégénérescence, notamment par l'expression de gènes développementaux. Il est intéressant de noter que malgré le peu de gènes altérés aux stades présymptomatiques, parmi eux pourraient se trouver des gènes éventuellement responsables du dysfonctionnement initial, de la dégénérescence progressive et de la perte ultime des NMCS. Ceci pourrait être le cas du gène *Scn1b*, identifié dans la SLA, et qui se révèle être surexprimé à ces âges-là. Du fait de sa pertinence, nous avons procédé à une première validation de ce gène.

#### 4.4 Méthodes de validation des données RNA-seq

Pour évaluer la force d'une approche transcriptomique et l'exactitude des données obtenues, une validation des gènes retenus est nécessaire. Elle consiste à vérifier les données, généralement au travers d'une autre approche. Il peut s'agir d'approches moléculaires telles que la qPCR, les techniques microfluidiques ou de cellules uniques ou d'approches histologiques telles que l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie. Ces techniques peuvent être complétées par la suite par des analyses protéomiques et fonctionnelles.

La première validation réalisée a porté sur le gène *Scn1b*. En effet, ce gène code pour une sous-unité  $\beta$  des canaux  $\text{Na}^+$  voltage dépendants (Nav) responsables de l'initiation du potentiel d'action. La protéine SCN1B régule l'activité des canaux Nav (densité des courants, cinétique et densité membranaire des canaux Nav) et joue donc un rôle dans l'excitabilité neuronale (Isom, 2001). Chez l'homme et chez la souris, des mutations sont retrouvées dans des cas d'épilepsie, maladie qui se caractérise par des décharges anormales et excessives des neurones (Helbig, 2015 ; Chen et al., 2004 ; Brackenbury et al., 2013). Plus précisément, chez la souris, la délétion génétique (KO) du gène *Scn1b* conduit à des crises épileptiques, une démarche ataxique et un retard de croissance (Chen et al., 2004 ; Brackenbury et al., 2013). Par ailleurs, le gène *Scn1b* a été retrouvé surexprimé dans les neurones mésencéphaliques du noyau trijumeau (Me5) des souris *Mecp2<sup>-Y</sup>*, un modèle murin du syndrome de Rett, une maladie neurodéveloppementale caractérisée par des défauts moteurs. Il a été suggéré que ce gène pourrait être en partie responsable de l'hyperexcitabilité des neurones Me5 dans ce modèle (Oginsky et al., 2017). Il est donc possible que la surexpression de *Scn1b* dans les NMCS issus des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* entraîne une hyperexcitabilité neuronale et contribue à l'hyperexcitabilité corticale observée chez les patients SLA et dans les

modèles murins dès les phases présymptomatiques (Fogarty et al., 2015; Vucic et al., 2008). De manière intéressante, une étude récente de transcriptomique par puces à ADN, réalisée sur des tissus post-mortem de patients SLA, a mis en évidence une augmentation similaire de l'expression du gène *SCN1B* dans l'aire 8 du cortex préfrontal (Andrés-Benito et al., 2017). L'augmentation d'expression de *Scn1b* pourrait être en partie responsable de l'augmentation persistante des conductances des canaux Nav qui est associée à la dégénérescence axonale dans la SLA (Vucic & Kiernan, 2008). Enfin, l'augmentation de l'expression de *Scn1b* semble caractéristique du dysfonctionnement des NMCS, puisque l'expression de *Scn1b* est inchangée dans la région de la moelle épinière contenant les MnBS de souris *SOD1<sup>G93A</sup>* présymptomatiques, et significativement diminuée à un stade symptomatique (Nutini et al., 2011). Ceci souligne la différence des cinétiques et modes de dégénérescence des NMCS et MnBS.

La validation du gène *Scn1b* a été réalisée par immunohistochimie, car elle permet de travailler sur tissu entier, sans avoir à réaliser de purification cellulaire délicate et coûteuse, tout en permettant de se concentrer sur un seul type cellulaire (les neurones situés dans la couche V du cortex moteur par exemple, ou encore les neurones exprimant les protéines CTIP2 ou CRYM). D'autre part, elle est facilement transposable de la souris à l'homme, et permet d'estimer rapidement la pertinence des gènes candidats dans la pathologie humaine. Des anticorps déjà testés sur tissus murins et publiés dans la littérature ont été employés pour cette validation.

Cette approche par immunofluorescence permet une première validation dérégulation transcriptionnelle du gène *Scn1b* révélée par RNA-seq. De même que pour le gène *Scn1b*, il est maintenant envisagé de poursuivre les validations sur tissus murins pour les autres gènes candidats sélectionnés. Ces gènes candidats seront ensuite validés sur des populations purifiées de NMCS et NPC à un stade présymptomatique (30 jours) et symptomatique (90 jours), par une technique récente de microfluidique (« NanoString nCounter ») (Geiss et al., 2008). Les candidats validés par ces approches sur tissus murins, et pour lesquels il existe des anticorps efficaces, seront évalués sur tissus cérébraux post-mortem de patients SLA et contrôles. La technologie « NanoString nCounter » pourra, dans un deuxième temps, être utilisée pour tester l'expression des mêmes gènes dans d'autres populations de NMCS, purifiés à partir du cortex cérébral d'autres modèles murins de SLA, ou encore de PSH, de manière à mettre en évidence des mécanismes moléculaires communs et/ou uniques à ces maladies neurodégénératives qui affectent sélectivement les NMCS.

À terme, ce projet de recherche vise à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques orientées vers le maintien d'une population saine de NMCS.

## **5. Purification de populations spécifiques de neurones corticaux, une nouvelle approche nécessaire pour l'accès au répertoire génique individuel**

### **5.1 L'apport des études du développement cortical dans la mise en place de nouveaux outils destinés aux études de pathologies neurodégénératives**

Les études du développement cortical ont permis l'avènement de méthodes permettant d'isoler des neurones corticaux spécifiques et ainsi des avancées considérables dans ce domaine. Ces méthodes reposent sur la purification par tri cellulaire par FACS de sous-populations neuronales corticales marquées de façon rétrograde avec des traceurs spécifiques (Katz & Iarovici, 1990), au stade embryonnaire (Arlotta et al., 2005; Catapano et al., 2001) et au stade postnatal (Arlotta et al., 2005; Catapano et al., 2001; Junger & Junger, 1998; Özdinler & Macklis, 2006). L'analyse transcriptionnelle de ces populations neuronales individuelles purifiées a ainsi permis la découverte de nouveaux marqueurs moléculaires spécifiques qui constituent aujourd'hui de précieux outils moléculaires pour l'étude de ces sous-populations, qu'il s'agisse de leur spécification au stade embryonnaire (Arlotta et al., 2005), ou de leur atteinte sélective en conditions pathologiques. Cependant, ces approches, malgré leur énorme potentiel technique, sont restées limitées à l'étude de neurones corticaux immatures, tels que les NMCS, dans le domaine du développement cortical (Arlotta et al., 2005; Catapano et al., 2001; Junger & Junger, 1998; Molyneaux et al., 2009, 2015; Özdinler & Macklis, 2006).

Aucune étude n'a porté jusqu'à présent, sur la purification et l'étude des neurones corticaux adultes dans les pathologies neurodégénératives. Confrontés à ce manque, nous avons décidé de tirer profit de ces outils techniques et de les adapter pour la première fois à une problématique purement neurodégénérative, à l'âge adulte (Marques et al., en cours de rédaction).

### **5.2 Développement d'une nouvelle méthode de purification de populations spécifiques de neurones corticaux à partir de cerveaux de souris adultes individuels.**

Nous avons récemment développé une approche expérimentale permettant, pour la première fois, la purification par FACS de populations spécifiques de neurones corticaux adultes à partir d'un cerveau de souris. Cette méthode a été appliquée à la population de NMCS et de NCP afin d'analyser leur profil d'expression génique en condition saine et pathologique. Elle a montré son efficacité, dans le cadre de notre précédente étude, en mettant en évidence des mécanismes moléculaires responsables de la dégénérescence des NMCS dans la SLA par séquençage de leurs ARN (RNA-seq) (Marques et al., en cours de rédaction).

Le protocole décrit ici est extrêmement délicat, car il repose sur une série d'optimisations de techniques difficiles qui s'inspirent de travaux précédemment développés chez les rongeurs au stade embryonnaire, aux premiers âges postnataux (Arlotta et al., 2005) et à l'âge adulte (Brewer & Torricelli, 2007; Guez-Barber et al., 2012). L'étude se rapprochant le plus de nos conditions est celle menée par Arlotta et ses collègues (2005) où des NMCS âgés de 14 jours ont été récoltés à partir d'un cerveau de souris. Cette étude souligne la difficulté de trier les NMCS chez des animaux âgés de 14 jours (P14) en modifiant leur protocole utilisé pour des stades embryonnaires, avec notamment l'ajout d'une étape de fixation avant le FACS et en collectant un nombre beaucoup plus faible de neurones (entre 10 000 et 30 000 NMCS à P2 et P6 contre 1000 NMCS à P14) (Arlotta et al., 2005). De ce fait, nous avons, à leur exemple, décidé de fixer les cellules après dissociation.

La technique de FACS a également été appliquée à des neurones striataux adultes en utilisant des souris transgéniques exprimant une protéine fluorescente verte (GFP, green fluorescent protein) sous le contrôle de promoteurs de gènes spécifiquement exprimés dans ce type cellulaire (Lobo et al., 2006) ou chez le rat en utilisant des anticorps contre des protéines intracellulaires ou extracellulaires (Guez-Barber et al., 2012). Toutefois, ces méthodes ont également nécessité l'utilisation de plusieurs cerveaux (2 à 4) pour obtenir une quantité suffisante de cellules. Une étude avait été menée par Srinivasan et ses collaborateurs sur un seul cerveau murin. Cependant, celle-ci n'a servi qu'à purifier la population totale de neurones corticaux du fait de l'utilisation d'un anticorps spécifique de tous les neurones (NeuN) et non une population neuronale corticale spécifique (Srinivasan et al., 2016). Nous avons cependant tiré profit d'un certain nombre d'éléments de ces deux dernières études. Ainsi, des pipettes Pasteur, de diamètres décroissants ont été choisies en prenant en compte le diamètre moyen des NMCS (25  $\mu\text{m}$ ) afin d'éviter la lyse cellulaire. Un gradient de densité de Percoll (Guez-Barber et al., 2012) a été appliqué afin d'éliminer les débris cellulaires et réduire de 60% la durée de tri de FACS. Ceci représente un avantage majeur pour des études nécessitant une analyse transcriptionnelle et par conséquent une préservation des ARN de la dégradation. Bien que Brewer et Torricelli (Brewer & Torricelli, 2007) n'aient pas procédé à un tri cellulaire des neurones adultes, ils ont utilisé un milieu de culture d'osmolarité et de pH contrôlé (Brewer & Price, 1996) que nous avons également utilisé puisqu'il permet d'assurer la viabilité cellulaire en dehors d'incubateurs spécifiques. D'autre part, le tri cellulaire par FACS est une technique stressante pour les cellules et peut de ce fait contribuer à la modification de leurs caractéristiques moléculaires (Arlotta et al., 2005; Lobo et al., 2006). En outre, l'utilisation de NMCS adultes moins résistants à la dissociation cellulaire et dans un contexte de neurodégénérescence apporte un degré de complexité supplémentaire pour l'obtention de cellules intègres. La fixation cellulaire à l'éthanol (Srinivasan et al., 2016) réalisée après dissociation permet

de figer ces mécanismes et limiter leurs modifications, avec une bonne préservation des ARN, contrairement au paraformaldéhyde. L'adaptation des paramètres de FACS en utilisant une buse de tri de diamètre 100µm, une pression de 12 (psi) et une vitesse de 400 événements par seconde a permis de procéder à un tri plus lent et plus doux des cellules. Enfin, le tissu est traité en 2h30 environ, de la microdissection du cerveau à la fixation de la suspension cellulaire avec de l'éthanol. Il est important d'effectuer ce protocole en un temps relativement court et à basse température afin d'assurer la viabilité cellulaire et préserver le profil d'expression génique.

L'optimisation de la dissociation cellulaire et la purification des NMCS par FACS permettent de collecter de 700 à 2 500 cellules par cerveau. Cette variabilité observée peut s'expliquer par la qualité du marquage rétrograde réalisé (nombre de cellules marquées et intensité de la fluorescence) et de l'étape de trituration. Ce rendement cellulaire apparaît relativement important lorsque l'on prend en considération la grande fragilité et vulnérabilité des neurones corticaux et notamment des NMCS due en partie à la grande taille de leurs corps cellulaires et leurs longs axones. En outre, ce rendement apparaît d'autant plus acceptable si l'on considère que cette purification provient d'un seul cerveau de souris adulte, une petite espèce par rapport à d'autres mammifères tels que le rat (Dugas et al., 2008). Ce rendement permet d'obtenir 1 à 2,7 ng d'ARN, avec une intégrité de 6 (RIN ; *RNA integrity number*), soit une quantité suffisante pour le séquençage (1 à 100 ng requis par la plateforme de séquençage). Afin de perdre le moins possible d'ARN et de préserver au mieux leur intégrité, nous avons fait le choix de procéder à une synthèse directe d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des culots cellulaires. Enfin, l'étape d'amplification de l'ADNc nécessaire pour le séquençage de l'ARN a été optimisée de façon à générer une quantité suffisante, mais non excessive de matériel afin ne pas altérer l'information transcriptionnelle. Les points techniques que nous venons d'aborder sont à prendre en compte en fonction de la nature de la question biologique. Par exemple, l'application de ce protocole à notre étude (Marques et al., publication 1) ne rend pas cette technique optimale pour l'analyse d'ARN non codant.

Pour finir, en se limitant à un animal par point, la « règle des trois R » des comités d'éthique (Raffinement, Réduction and Remplacement) est respectée, le nombre de chirurgies et de purifications se trouve par conséquent largement diminué et cela permet également de limiter l'étude à un seul sexe et d'obtenir des résultats statistiquement plus fiables. En permettant la purification de neurones corticaux adultes en condition saine, mais également pathologique, cette méthode permet d'aborder de nouvelles problématiques dans un contexte de maladies neurodégénératives à l'âge adulte, telles que l'étude des maladies SLP ou PSH qui présentent toutes deux une atteinte des NMCS. Il serait également envisageable d'étudier d'autres populations

cellulaires telles que les interneurons corticaux exprimant la PV (Nihei et al., 1993) ou la SST (Zhang et al., 2016), également atteints dans la pathologie.

### 5.3 Validation de la méthode développée

La qualité de notre purification a été validée par trois approches différentes : microscopique, qPCR et RNA-seq.

L'observation microscopique, avant et après FACS, a montré un enrichissement en cellules d'intérêt. En effet, dans la suspension cellulaire dissociée, un mélange de cellules fluorescentes et non fluorescentes est observé. En revanche, après tri cellulaire, la suspension contient uniquement des cellules fluorescentes, signe d'une bonne purification de notre population d'intérêt (cf. publication 2, fig. 6).

La qualité de la purification et de l'identité des cellules triées ont été confirmées par qPCR et RNA-seq. Un enrichissement de l'expression de gènes exprimés par les neurones de la couche V du cortex, notamment les NMCS a été obtenu dans la population cellulaire marquée par rapport à la population contrôle (cf publication 2, fig. 6). De même, un enrichissement de l'expression de gènes exprimés par les NCP a été observé. En revanche, il n'a pas été observé d'enrichissement de l'expression de gènes spécifiques de populations d'interneurones, d'astrocytes et des microglies présentes dans les mêmes couches corticales des deux populations triées (résultats non montrés).

Dans l'ensemble, l'observation microscopique et les données transcriptionnelles valident la pureté et l'identité des NMCS et des NCP triés par cytométrie en flux.

### 5.4 La cytométrie de flux, une méthode de choix pour la purification des neurones corticaux adultes et l'analyse transcriptomique

Le FACS nécessite une plate-forme de cytométrie de flux et peut généralement trier des milliers de cellules dans un temps relativement court (Cahoy et al., 2008; Lobo et al., 2006; Marsh et al., 2008). Cette technique permet de détecter simultanément plusieurs spectres de fluorescence et, par conséquent, de multiples marqueurs fluorescents cellulaires. Ceci est particulièrement utile étant donné que de nombreux types de cellules, notamment dans le cortex cérébral, ne peuvent être identifiés que par l'expression combinatoire de plusieurs gènes (Arlotta et al., 2005; Molyneaux et al., 2015). En outre, les propriétés de dispersion de la lumière mesurées par le FACS permettent de renseigner la taille de la cellule, la morphologie et la complexité intracellulaire (granularité). Le FACS permet donc une analyse multiparamétrique d'un ensemble de propriétés cellulaires. Cependant comme vu précédemment, cette technique est assez stressante pour les neurones matures



(Arlotta et al., 2005; Lobo et al., 2006) et de ce fait peut s'avérer ne pas être optimale pour certaines études qui ne permettent pas une fixation cellulaire telle que la culture cellulaire.

Les méthodes alternatives actuelles s'appuient sur l'aspiration manuelle de cellules fluorescentes (Hempel et al., 2007; Sugino et al., 2006), le gradient de densité (Brewer & Torricelli, 2007), et l'immunopanning de neurones avec des anticorps spécifiques (Cahoy et al., 2008; Zhang, Chen, et al., 2014) ou combiné au marquage rétrograde (Dugas et al., 2008; Mandemakers, 2014). Ces techniques, bien que moins coûteuses et plus douces que le FACS présentent cependant des inconvénients. L'aspiration manuelle des cellules à l'aide d'une pipette en verre permet, tout comme le FACS, d'obtenir des échantillons de haute pureté (Hempel et al., 2007), ce qui en fait une méthode bien adaptée à l'étude transcriptomique. Cependant, la purification est longue, très fastidieuse, nécessite une personne très compétente, et ne permet l'obtention que d'un faible nombre de cellules (une centaine en moyenne) (Hempel et al., 2007; Sugino et al., 2006).

Contrairement au FACS et à la technique manuelle, la technologie d'immunopanning ne repose pas sur un signal fluorescent pour détecter des populations cellulaires spécifiques (Barres et al., 1988). Elle nécessite néanmoins l'existence d'anticorps qui reconnaissent spécifiquement des protéines de surface de la population cellulaire d'intérêt. Cette méthode est donc limitée aux types cellulaires pouvant être identifiés par un antigène de surface et dont un anticorps existe, ce qui n'est pas le cas des neurones corticaux qui ne présentent pas de marqueurs géniques spécifiques d'une seule population neuronale. Cette technique a donc uniquement permis, au niveau cortical, la purification de grands types cellulaires tels que les astrocytes, les microglies et les neurones (Zhang, Chen, et al., 2014). La pureté de la population cellulaire résultante dépend également de la spécificité de l'anticorps. Certaines études ont contourné ce problème en introduisant un antigène de surface cellulaire exogène, pour lequel un anticorps hautement spécifique existe (Dale et al, 1995), dans une population cellulaire par le biais d'un transport rétrograde de cet antigène. Dugas et ses collaborateurs (2008) ont utilisé la toxine du choléra B (CTB) adsorbée à des microbilles fluorescentes (Mandemakers, 2014) pour identifier et purifier les NMCS. Néanmoins, du fait de la digestion des CTB de surface par l'enzyme papaïne lors de l'étape de dissociation cellulaire et du temps relativement long pour permettre le recyclage des CTB intracellulaires à la surface après traitement, cette méthode ne semble pas appropriée pour l'isolement de neurones matures. En effet, ces derniers nécessitent d'être traités rapidement, ce qui se reflète dans les résultats obtenus à P10 où un rendement trop faible de cellules a été obtenu (Dugas et al., 2008). Enfin, l'isolement de cellules par gradient de densité ne permet la purification que de grands types cellulaires (neurone, microglie, astrocyte).

Par ailleurs, une alternative à l'isolement cellulaire sans tri cellulaire est la microdissection par capture laser. En effet, elle permet d'extraire un type cellulaire à partir de sections tissulaires fixées ou congelées (Datta et al., 2015; Kamme et al., 2003; Tietjen et al., 2003). Néanmoins, la découpe cellulaire est longue, laborieuse et reste assez grossière ce qui conduit à une contamination importante des échantillons.

Ainsi par rapport à ces techniques, le FACS semble être la méthode la plus appropriée pour purifier des neurones corticaux adultes dont les NMCS recherchés dans notre étude.

Par ailleurs, d'autres méthodes que le FACS offrent la possibilité d'isoler des ARN, telles que la microdissection par capture laser (dont nous venons de parler) et la technique de purification de ribosomes marqués génétiquement (TRAP, *Translating ribosome affinity purification*). La microdissection par capture laser est utile pour l'analyse de l'expression des gènes de cellules issues de tissus post-mortem humains fixés ou congelés. Cependant, elle fournit de faibles quantités d'ARNm imposant une amplification élevée (Datta et al., 2015). La technique TRAP permet quant à elle de collecter directement les ARNm de neurones spécifiques à partir d'homogénats tissulaires obtenus de souris transgéniques (Heiman et al., 2014; Sanz et al., 2009). Ainsi, la TRAP ne donne l'accès qu'à l'étude d'une seule population cellulaire où elle ne détecte que les ARNm associés aux ribosomes marqués et ne permet pas d'avoir accès aux ARN non codants et aux protéines (Heiman et al., 2014; Sanz et al., 2009). En outre, étant donné qu'elle nécessite l'utilisation de lignées de souris spécifiques, les méthodes citées précédemment sont actuellement applicables à un éventail plus large de types cellulaires. Néanmoins de nouvelles lignées de souris compatibles avec cette technique se développent et permettent par exemple l'isolement d'ARN de neurones cortico-striataux de la couche V (Schmidt et al., 2012). À plus long terme, cette méthode pourra élargir son spectre d'application à d'autres types cellulaires, dès lors que des promoteurs uniques pourront être identifiés.

## 5.5 Un protocole, un éventail d'applications

Notre méthode initialement développée pour purifier les NMCS chez des souris adultes en condition saine ou pathologique en vue de leur analyse transcriptionnelle par RNA-seq (Marques *et al.*, publication 1) peut se prêter à d'autres applications.

En effet, cette méthode peut s'appliquer à l'étude de toute population neuronale corticale adulte pouvant être identifiée dans un contexte de recherche fondamentale ou appliquée telle que les maladies neurodégénératives ou neurologiques. Elle peut être utilisée également pour purifier des neurones d'autres régions cérébrales du cerveau de souris (Lobo et al., 2006). Bien que cette

méthode soit basée sur l'identification des NMCS par injection rétrograde de microbilles fluorescentes vertes, il est possible à présent d'envisager le marquage des NMCS par d'autres méthodes alternatives telles que le marquage génétique. Plusieurs lignées de souris transgéniques rapportrices sont disponibles et sont utilisées pour étudier différents types cellulaires du SNC tels que les neurones corticaux. Parmi ces lignées se trouvent les souris *Thy1-YFP* qui expriment la protéine fluorescente YFP (*yellow fluorescent protein*) sous le contrôle du promoteur du gène *Thy1* (exprimé dans les neurones de projection cérébraux), et sont utilisés pour marquer et étudier les neurones corticaux, tels que ceux de la couche V (Feng et al., 2000; Fukuda et al., 2006; Oray et al., 2004; Sugino et al., 2006; Yasvoina et al., 2013; Yu et al., 2008). Ces lignées ont été employées pour étudier le système moteur dans la SLA par des croisements avec des modèles murins *SOD1* (Özdinler et al., 2011; Schaefer et al., 2005) ou dans les lésions de la moelle épinière (Bayere et al., 2005). Parmi ces lignées se trouvent également les souris *UCHL1-eGFP* dans lesquelles le promoteur du gène *UCHL1* permet l'expression du gène codant pour la protéine eGFP dans les neurones à projection sous-cérébrale de la couche V dont les NMCS (Yasvoina et al., 2013). De plus, des souris *SOD1-UeGFP* ont été générées (Yasvoina et al., 2013). Ces rapporteurs pourraient être utilisés, en combinaison avec le marquage rétrograde, afin de purifier avec la technique développée, les neurones GFP-positifs de la couche V parallèlement aux NMCS doublement marqués afin de rechercher s'il existe un gène dont l'expression serait limitée aux NMCS. Si un tel gène existe, alors il serait alors possible de générer une lignée de souris transgéniques rapportrices NMCS-spécifique.

Enfin, comme ce protocole a été optimisé pour de petites quantités cellulaires et a été appliqué avec succès sur un seul cerveau de souris plus petit que d'autres rongeurs, cette méthode pourrait être utilisée pour d'autres espèces telles que le rat.

Le protocole développé permet l'extraction d'ARNm ou la synthèse directe d'ADNc après tri cellulaire. Différentes techniques d'analyse d'expression de gènes peuvent être effectuées en aval, telles que la qPCR (Özdinler & Macklis, 2006), les puces à ADN (Arlotta et al., 2005; Catapano et al., 2001; Molyneaux et al., 2009), la technologie microfluidique ou encore le séquençage de cellules uniques (« single cell ») (Tasic et al., 2016). Cependant, il est important de souligner que l'application de ce protocole est fonction de la nature de la question biologique et du rendement de l'ARN souhaité, qui dépend de l'abondance du type de cellule utilisé. L'application de ce protocole à l'objet de notre étude a permis de comparer le profil d'expression génique des NMCS sains ou pathologiques afin de démêler les processus cellulaires impliqués dans leur dégénérescence. La technique de RNA-seq a été utilisée puisqu'elle permet un séquençage profond de l'ARN, est plus sensible que les puces à ADN et peut être appliquée à de petites quantités d'ARN.

# **CONCLUSION**

## CONCLUSION

Ce travail de thèse s'est construit dans un contexte où la recherche sur la SLA subit une transition, avec les reconsidérations à la fois d'idées admises et d'hypothèses oubliées. Bien que l'émergence de preuves génétiques, fonctionnelles et histologiques pointe vers un rôle initiateur du cortex cérébral et l'hypothèse d'une dégénérescence antérograde, la dynamique spatio-temporelle de la dégénérescence des NMCS et les mécanismes moléculaires qui la sous-tendent restent largement méconnus. Dans ce contexte, ce projet de thèse a reposé sur trois grandes questions : 1) *Par quelle dynamique spatio-temporelle dégénèrent les NMCS dans le modèle murin  $Sod1^{G86R}$  ?* 2) *Dans quel environnement cortical se produit cette neurodégénérescence ?* 3) *Quels sont les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la dégénérescence sélective des NMCS au cours de la SLA ?*

La combinaison de marquage rétrograde et d'une quantification précise et rigoureuse de la population totale de NMCS ou de  $NMCS_{Lomb}$  a mis en évidence que les souris  $Sod1^{G86R}$  récapitulent la relation somatotopique entre les atteintes corticales et spinales décrite chez les patients atteints de SLA, et indique que, chez ces animaux, la dégénérescence suit une progression descendante, du cortex cérébral vers la moelle épinière et les muscles. Ces résultats apparaissent d'autant plus pertinents lorsque l'on considère les différences d'organisation du TCS qui existent entre l'homme et la souris. Il est possible d'envisager que cette dynamique spatio-temporelle de dégénérescence des NMCS chez la souris puisse n'être qu'une version atténuée de la réalité humaine. En effet chez l'homme, l'existence d'un nombre bien plus important de connexions monosynaptiques pourrait entraîner une dynamique de dégénérescence bien plus prononcée. Néanmoins, les similarités observées entre notre modèle murin  $Sod1^{G86R}$  et les patients suggèrent fortement que les neurones NMCS dégénéreraient selon les mêmes mécanismes et justifient le regard porté sur les mécanismes moléculaires extrinsèques et intrinsèques qui régissent leur dégénérescence dans ce modèle.

La caractérisation de l'environnement cortical entreprise, bien que préliminaire, semble suggérer que les NMCS dégénèrent dans un environnement différent de celui des MnBS. Elle laisse envisager la possibilité d'une dégénérescence de ces deux populations selon des mécanismes moléculaires qui leurs seraient propres. Ces premières données soulignent l'intérêt d'étudier plus précisément la façon dont les NMCS meurent au cours de la maladie. Ces dernières complétées par les analyses transcriptionnelles et histologiques des tissus corticaux à différents âges permettront, une meilleure compréhension des mécanismes extrinsèques qui prennent place lors de la dégénérescence des NMCS. Cette caractérisation combinée à l'identification des mécanismes intrinsèques de dégénérescence des NMCS permettra d'avoir une meilleure compréhension de leur physiopathologie.

## CONCLUSION

L'approche expérimentale développée a permis de purifier, pour la première fois, des NMCS adultes, sains et en conditions pathologiques afin d'identifier les mécanismes moléculaires qui déclenchent sélectivement le dysfonctionnement et la mort de ces neurones au cours de la SLA. L'exploration des données transcriptomiques provenant de ces populations nous a permis d'établir une première liste de 21 gènes candidats. Des acteurs moléculaires nouveaux et précoces ont été identifiés et fournissent ainsi une base pour le développement d'approches thérapeutiques basées sur le maintien de NMCS sains et fonctionnels. À l'heure actuelle, une première validation de ces gènes candidats par immunohistologie est réalisée. Celle-ci va prochainement être complétée par une analyse transcriptionnelle sur des populations purifiées de NMCS et de NPC à un stade présymptomatique et symptomatique afin de valider les altérations précoces et/ou tardives qui ont été identifiées par RNA-seq. Les gènes candidats validés seront ensuite testés sur des tissus corticaux humains de patients SLA, pour vérifier leur pertinence dans la pathologie humaine. À plus long terme, les meilleurs candidats seront soumis à des analyses fonctionnelles dans des modèles simplifiés *in vitro* et *in vivo* chez le rongeur, par des approches de gain ou perte de fonction et/ou des approches pharmacologiques afin de comprendre leur implication dans la mort des NMCS.

Ainsi, ce projet de thèse ouvre la voie vers la découverte de mécanismes (intrinsèques et extrinsèques) responsables de la dégénérescence spécifique des NMCS dans la SLA, destinés à informer le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques orientées vers le maintien d'une population saine et fonctionnelle de NMCS, dans cette pathologie, mais également dans d'autres maladies neurodégénératives affectant les NMCS, telles que la SLP ou la PSH.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

- Abe, K., Fujimura, H., Kobayashi, Y., Fujita, N., & Yanagihara, T. (1997). Degeneration of the pyramidal tracts in patients with amyotrophic lateral sclerosis. A premortem and postmortem magnetic resonance imaging study. *Journal of Neuroimaging*, 7(4), 208–212.
- Agosta, F., Valsasina, P., Riva, N., Copetti, M., Messina, M. J., Prella, A., Comi, G., & Filippi, M. (2012). The cortical signature of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 7(8), 1–8.
- Akintunde, A., & Buxton, D. F. (1992a). Differential sites of origin and collateralization of corticospinal neurons in the rat: a multiple fluorescent retrograde tracer study. *Brain Research*, 575(1), 86–92.
- Akintunde, A., & Buxton, D. F. (1992b). Origins and collateralization of corticospinal, corticopontine, corticorubral and corticostriatal tracts: a multiple retrograde fluorescent tracing study. *Brain Research*, 586(2), 208–218.
- Al-Chalabi, A., Andersen, P. M., Nilsson, P., Chioza, B., Andersson, J. L., Russ, C., Shaw, C. E., Powell, J. F., & Leigh, P. N. (1999). Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 8(2), 157–164.
- 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), 339–352.
- Al-Sarraj, S., King, A., Troakes, C., Smith, B., Maekawa, S., Bodi, I., Rogelj, B., Al-Chalabi, A., Hortobágyi, T., & Shaw, C. E. (2011). P62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTL and MND/ALS. *Acta Neuropathologica*, 122(6), 691–702.
- Alami, N. H., Smith, R. B., Carrasco, M. A., Williams, L. A., Winborn, C. S., Han, S. S. W., Kiskinis, E., Winborn, B., Freibaum, B. D., Kanagaraj, A., Clare, A. J., Badders, N. M., Bilican, B., Chaum, E., Chandran, S., Shaw, C. E., Eggan, K. C., Maniatis, T., & Taylor, J. P. (2014). Axonal Transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron*, 81(3), 536–543.
- Alexander, G. M., Erwin, K. L., Byers, N., Deitch, J. S., Augelli, B. J., Blankenhorn, E. P., & Heiman-Patterson, T. D. (2004). Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 130(1–2), 7–15.
- Alexianu, M. E., Kozovska, M., & Appel, S. H. (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology*, 57(7), 1282–1289.
- Allen, M. J., Lacroix, J. J., Ramachandran, S., Capone, R., Whitlock, J. L., Ghadge, G. D., Arnsdorf, M. F., Roos, R. P., & Lal, R. (2012). Mutant SOD1 forms ion channel: Implications for ALS pathophysiology. *Neurobiology of Disease*, 45(3), 831–838.
- Allendoerfer, K. L., & Shatz, C. J. (1994). The subplate, a transient neocortical structure : Its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 185–218.
- Alshikho, M., Zürcher, N., Loggia, M., Cernasov, P., Chonde, D., Izquierdo Garcia, D., Yasek, J., Akeju, O., Catana, C., Rosen, B., Cudkowicz, M., Hooker, J., & Atassi, N. (2016). Glial activation colocalizes with structural abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 87(24), 2554–2561.
- Andersen, P. M., & Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nature Reviews Neurology*, 7(11), 603–615.
- Andersen, P. M., Forsgren, L., Binzer, M., Nilsson, P., Ala-Hurula, V., Keränen, M.-L., Bergmark, L., Saarinen, A., Haltia, T., Tarvainen, I., Kinnunen, E., Udd, B., & Marklund, S. L. (1996). Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain*, 119(4), 1153–1172.
- Anderson, S. A., Kaznowski, C. E., Horn, C., Rubenstein, J. L. R., & McConnell, S. K. (2002). Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons In vivo. *Cerebral Cortex*, 12(7), 702–709.
- Anderson, S. A., Marín, O., Horn, C., Jennings, K., & Rubenstein, J. L. R. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*, 128(3), 353–363.
- Andrés-Benito, P., Moreno, J., Aso, E., Povedano, M., & Ferrer, I. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis, gene deregulation in the anterior horn of the spinal cord and frontal cortex area 8: implications in frontotemporal lobar degeneration. *Aging*, 9(3), 823–851.
- Apicella, A. J., Wickersham, I. R., Seung, H. S., & Shepherd, G. M. (2012). Laminarily Orthogonal Excitation of Fast-Spiking and Low-Threshold-Spiking Interneurons in Mouse Motor Cortex. *Journal of Neuroscience*, 32(20), 7021–7033.
- Araki, T., Nagano, S., Tateno, M., Kaido, M., Ogata, K., & Arima, K. (2012). Misfolded SOD1 forms high-density molecular complexes with synaptic molecules in mutant SOD1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis cases. *Journal of the Neurological Sciences*, 314(1–2), 92–96.
- Arbour, D., Tremblay, E., Martineau, E., Julien, J.-P., & Robitaille, R. (2015). Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model. *Journal of Neuroscience*, 35(2), 688–706.
- Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., & Macklis, J. D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, 45(2), 207–221.
- Arundine, M., & Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34(4–5), 325–337.
- Ash, P. E. A., Bieniek, K. F., Gendron, T. F., Caulfield, T., Lin, W. L., DeJesus-Hernandez, M., Van Blitterswijk, M. M., Jansen-



## BIBLIOGRAPHIE

- West, K., Paul, J. W., Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W., & Petrucelli, L. (2013). Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron*, *77*(4), 639–646.
- Atkin, J. D., Farg, M. A., Turner, B. J., Tomas, D., Lysaght, J. A., Nunan, J., Rembach, A., Nagley, P., Beart, P. M., Cheema, S. S., & Horne, M. K. (2006). Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 30152–30165.
- Atkin, J. D., Farg, M. A., Walker, A. K., McLean, C., Tomas, D., & Horne, M. K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, *30*(3), 400–407.
- Aulas, A., & Vande Velde, C. (2015). Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 1–13.
- Bachmann, L. C., Lindau, N. T., Felder, P., & Schwab, M. E. (2014). Sprouting of brainstem-spinal tracts in response to unilateral motor cortex stroke in mice. *The Journal of Neuroscience*, *34*(9), 3378–3389.
- Baker, S. N. (2011). The primate reticulospinal tract, hand function and functional recovery. *Journal of Physiology*, *589*(23), 5603–5612.
- Barber, S., & Shaw, P. (2010). Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology and Medicine*, *48*(5), 629–641.
- Barres, B., Silverstein, B., Corey, D., & Chun, L. (1988). Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron*, *1*(9), 791–803.
- Barthélemy, D., Grey, M. J., Nielsen, J. B., & Bouyer, L. (2011). Involvement of the corticospinal tract in the control of human gait. *Progress in Brain Research*, *192*, 181–197.
- Battistini, S., Giannini, F., Greco, G., Bibbò, G., Ferrera, L., Marini, V., Causarano, R., Casula, M., Lando, G., Patrosso, M. C., Caponnetto, C., Origone, P., Marocchi, A., Del Corona, A., Siciliano, G., Carrera, P., Mascia, V., Giagheddu, M., Carcassi, C., Orrù, S., Garrè, C., & Penco, S. (2005). SOD1 mutations in amyotrophic lateral sclerosis: results from a multicenter Italian study. *Journal of Neurology*, *252*(7), 782–788.
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., Dai, X., & Simmons, J. A. (1991). Cell Migration in the Rat Embryonic Neocortex. *The Journal of Comparative Neurology*, *307*(3), 499–516.
- Beckman, J. S., Carson, M., Smith, C. D., & Koppenol, W. H. (1993). ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*.
- Benatar, M. (2007). Lost in translation: treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiology of Disease*, *26*(1), 1–13.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., & Meininger, V. (1994). A controlled trial of Riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole study group. *The New England Journal of Medicine*, *330*(9), 585–591.
- Bishop, J. R., Stanford, K. I., & Esko, J. D. (2008). Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, *19*(3), 307–313.
- Blackstone, C. (2012). Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia. *Annual Review of Neuroscience*, *35*, 25–47.
- Blair, I. P., Williams, K. L., Warraich, S. T., Durnall, J. C., Thoeng, A. D., Manavis, J., Blumbergs, P. C., Vucic, S., Kiernan, M. C., & Nicholson, G. A. (2010). FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *81*(6), 639–645.
- Bogdanov, M., Brown, R. H., Matson, W., Smart, R., Hayden, D., O'Donnell, H., Flint Beal, M., & Cudkovic, M. (2000). Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radical Biology and Medicine*, *29*(7), 652–658.
- Boillée, S., Vande Velde, C., & Cleveland, D. W. W. (2006). ALS: A disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, *52*(1), 39–59.
- Bosco, D. A., Morfini, G., Karabacak, N. M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B. A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., Frosch, M. P., Agar, J. N., Julien, J.-P., Brady, S. T., & Brown, R. H. (2010). Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nature Neuroscience*, *13*(11), 1396–1403.
- Bourane, S., Grossmann, K. S., Britz, O., Dalet, A., Del, M. G., Stam, F. J., Garcia-campmany, L., Koch, S., & Goulding, M. (2015). Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell*, *160*(3), 503–515.
- Bouteloup, C., Desport, J. C., Clavelou, P., Guy, N., Derumeaux-Burel, H., Ferrier, A., & Couratier, P. (2009). Hypermetabolism in ALS patients: An early and persistent phenomenon. *Journal of Neurology*, *256*(8), 1236–1242.
- Braak, H., Bretschneider, J., Ludolph, A. C., Lee, V. M., John, Q., & Del Tredici, K. (2013). Amyotrophic lateral sclerosis—a model of corticofugal axonal spread. *Nature Reviews. Neurology*, *9*(12), 708–714.
- Braak, H., Ludolph, A. C., Neumann, M., Ravits, J., & Del Tredici, K. (2017). Pathological TDP-43 changes in Betz cells differ from those in bulbar and spinal  $\alpha$ -motoneurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, *133*(1), 79–90.
- Bretschneider, J., Del Tredici, K., Toledo, J. B., Robinson, J. L., Irwin, D. J., Grossman, M., Suh, E., Van Deerlin, V. M., Wood, E. M., Baek, Y., Kwong, L., Lee, E. B., Elman, L., McCluskey, L., Fang, L., Feldengut, S., Ludolph, A. C., Lee, V. M. Y., Braak, H., & Trojanowski, J. Q. (2013). Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *74*(1), 20–38.

## BIBLIOGRAPHIE

- Brettschneider, J., Toledo, J. B., van Deerlin, V. M., Elman, L., McCluskey, L., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2012). Microglial activation correlates with disease progression and upper motor neuron clinical symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, *7*(6), 1–10.
- Brewer, G., & Price, P. (1996). Viable cultured neurons in ambient carbon dioxide and hibernation storage for a month. *Neuroreport*, *7*(9), 1509–1512.
- Brewer, G., & Torricelli, J. (2007). Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nature Protocols*, *2*(6), 1490–1498.
- Bristol, L. A., & Rothstein, J. D. (1996). Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Annals of Neurology*, *39*(5), 676–679.
- Bromberg, M. B., & Brownell, A. A. (2008). Motor unit number estimation in the assessment of performance and function in motor neuron disease. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, *19*(3), 509–532.
- Brooks, B. R. (1994). El escorial world federation of neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, *124*, 96–107.
- Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., & Munsat, T. L. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, *1*(5), 293–299.
- Brown, R. H., & Robberecht, W. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis. *Seminars in Neurology*, *21*(2), 131–140.
- Bruijn, L., Houseweart, M., Kato, S., Anderson, K., Anderson, S., Ohama, E., Reaume, A., Scott, R., & Cleveland, D. (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*, *281*(5384), 1851–1854.
- Burrell, J. R., Kiernan, M. C., Vucic, S., & Hodges, J. R. (2011). Motor Neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain*, *134*(9), 2582–2594.
- Butman, J. A., & Floeter, M. K. (2007). Decreased thickness of primary motor cortex in primary lateral sclerosis. *American Journal of Neuroradiology*, *28*(1), 87–91.
- Büttner-Ennever, J. A. (2006). The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy. *Progress in Brain Research*, *151*, 95–125.
- Caballero-Hernandez, D., Toscano, M. G., Cejudo-Guillen, M., Garcia-Martin, M. L., Lopez, S., Franco, J. M., Quintana, F. J., Roodveldt, C., & Pozo, D. (2016). The “Omics” of amyotrophic lateral sclerosis. *Trends in Molecular Medicine*, *22*(1), 53–67.
- Cahoy, J., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L., Zamanian, J., Christopherson, K., Xing, Y., Lubischer, J., Krieg, P., Krupenko, S., Thompson WJ, & Barres, B. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience*, *28*(1), 264–278.
- Campbell, A. W. (1904). Histological Studies on the Localisation of Cerebral Function. *The British Journal of Psychiatry*, *50*(211), 651–662.
- Canty, A. J., & Murphy, M. (2008). Molecular mechanisms of axon guidance in the developing corticospinal tract. *Progress in Neurobiology*, *85*(2), 214–235.
- Carriedo, S. G., Yin, H. Z., & Weiss, J. H. (1996). Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *The Journal of Neuroscience*, *16*(13), 4069–4079.
- Carvalho, M., Schwartz, M. S., & Swash, M. (1995). Involvement of the external anal sphincter in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, *18*(8), 848–853.
- Catapano, L. A., Arnold, M. W., Perez, F. A., & Macklis, J. D. (2001b). Specific neurotrophic factors support the survival of cortical projection neurons at distinct stages of development. *Journal of Neuroscience*, *21*(22), 8863–8872.
- Cervenakova, L., Protas, I. I., Hirano, a, Votjakov, V. I., Nedzved, M. K., Kolomiets, N. D., Taller, I., Park, K. Y., Sambuughin, N., Gajdusek, D. C., Brown, P., & Goldfarb, L. G. (2000). Progressive muscular atrophy variant of familial amyotrophic lateral sclerosis (PMA/ALS). *Journal of the Neurological Sciences*, *177*(2), 124–130.
- Chan, S., Kaufmann, P., Shungu, D. C., & Mitsumoto, H. (2003). Amyotrophic lateral sclerosis and primary lateral sclerosis: evidence-based diagnostic evaluation of the upper motor neuron. *Neuroimaging Clinics of North America*, *13*(2), 307–326.
- Chang, Q., & Martin, L. J. (2009). Glycinergic innervation of motoneurons is deficient in amyotrophic lateral sclerosis mice: a quantitative confocal analysis. *The American Journal of Pathology*, *174*(2), 574–585.
- Chang, Q., & Martin, L. J. (2011). Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, *31*(8), 2815–2827.
- Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., Tian, G., Ilieva, H., Cleveland, D. W., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Wong, P. C., & Lin, C. L. G. (2008). Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS ONE*, *3*(8), 1–19.
- Charcot, J. ., & Joffroy, A. (1869). Deux cas d’atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et de faisceaux anterolatéraux de la moelle épinière. *Archives de Physiologie Normale et Pathologique*, *1*, 354–367.
- Chen, B., Schaevez, L. R., & McConnell, S. K. (2005). Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(47),

## BIBLIOGRAPHIE

17184–17189.

Chen, C., Westenbroek, R., Xu, X., Edwards, C., Sorenson, D., Chen, Y., McEwen, D., O'Malley, H., Bharucha, V., Meadows, L., Knudsen, G., Vilaythong, A., Noebels, J., Saunders, T., Scheuer, T., Shrager, P., Catterall, W., & Isom, L. (2004). Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *Journal of Neuroscience*, *24*(16), 4030–4042.

Chen, S., Zhang, X., Song, L., & Le, W. (2012). Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathology*, *22*(1), 110–116.

Chew, J., Gendron, T., Prudencio, M., Sasaguri, H., Zhang, Y., Castanedes-Casey, M., Lee, C., Jansen-West, K., Kurti, A., Murray, M., Bieniek, K., Bauer, P., Whitelaw, E., Rousseau, L., Stankowski, J., Stetler, C., Daugherty, L., Perkerson, E., Desaro, P., Johnston, A., Overstreet, K., Edbauer, D., Rademakers, R., Boylan, K., Dickson, D., Fryer, J., & Petrucelli, L. (2015). C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science*, *348*(6239), 1–11.

Chi, L., Ke, Y., Luo, C., Li, B., Gozal, D., Kalyanaraman, B., & Liu, R. (2006). Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells*, *24*(1), 34–43.

Chio, A., Pagani, M., Agosta, F., Calvo, A., Cistaro, A., & Filippi, M. (2014). Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. *The Lancet Neurology*, *13*(12), 1228–1240.

Chiu, C. Q., Lur, G., Morse, T. M., Carnevale, N. T., Ellis-Davies, G. C. R., & Higley, M. J. (2013). Compartmentalization of GABAergic Inhibition by Dendritic Spines. *Science*, *340*(6133), 759–762.

Chou, S., & Norris, F. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis: lower motor neuron disease spreading to upper motor neurons. *Muscle and Nerve*, *16*(8), 864–869.

Cipolat Mis, M. S., Brajkovic, S., Frattini, E., Di Fonzo, A., & Corti, S. (2016). Autophagy in motor neuron disease: Key pathogenetic mechanisms and therapeutic targets. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *72*, 84–90.

Ciura, S., Sellier, C., Campanari, M. L., Charlet-Berguerand, N., & Kabashi, E. (2016). The most prevalent genetic cause of ALS-FTD, C9orf72 synergizes the toxicity of ATXN2 intermediate polyglutamine repeats through the autophagy pathway. *Autophagy*, *12*(8), 1406–1408.

Clark, R. M., Blizzard, C. A., Young, K. M., King, A. E., & Dickson, T. C. (2017). Calretinin and neuropeptide Y interneurons are differentially altered in the motor cortex of the SOD1G93A mouse model of ALS. *Scientific Reports*, *7*, 1–13.

Clascá, F., Rubio-Garrido, P., & Jabaudon, D. (2012). Unveiling the diversity of thalamocortical neuron subtypes. *European Journal of Neuroscience*, *35*(10), 1524–1532.

Clement, A., Nguyen, M., Roberts, E., Garcia, M., Boillée, S., Rule, M., McMahon, A., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R., Brown, R. J., Julien, J., Goldstein, L., & Cleveland, D. (2003). Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*, *302*(5642), 113–117.

Corbo, M., & Hays, A. (1992). Peripherin and neurofilament protein coexist in spinal spheroids of motor neuron disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *51*(5), 531–537.

Corcia, P., Tauber, C., Vercoullie, J., Arlicot, N., Prunier, C., Praline, J., Nicolas, G., Venel, Y., Hommet, C., Baulieu, J. L., Cottier, J. P., Roussel, C., Kassiou, M., Guilloteau, D., & Ribeiro, M. J. (2012). Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, *7*(12), 1–7.

Corrado, L., Carlomagno, Y., Falasco, L., Mellone, S., Godi, M., Cova, E., Cereda, C., Testa, L., Mazzini, L., & D'Alfonso, S. (2011). A novel peripherin gene (PRPH) mutation identified in one sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient. *Neurobiology of Aging*, *32*(3), 552.e1-552.e6.

Couratier, P., Corcia, P., Lautrette, G., Nicol, M., Preux, P. M., & Marin, B. (2016). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a review of literature. *Revue Neurologique*, *172*(1), 37–45.

Coussee, E., De Smet, P., Bogaert, E., Elens, I., Van Damme, P., Willems, P., Koopman, W., Van Den Bosch, L., & Callewaert, G. (2011). G37R SOD1 mutant alters mitochondrial complex I activity, Ca<sup>2+</sup> uptake and ATP production. *Cell Calcium*, *49*(4), 217–225.

Cozzolino, M., & Carri, M. T. (2012). Mitochondrial dysfunction in ALS. *Progress in Neurobiology*, *97*(2), 54–66.

Cozzolino, M., Ferri, A., & Teresa Carri, M. (2008). Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, *10*(3), 405–443.

Crippa, V., Boncoraglio, A., Galbiati, M., Aggarwal, T., Rusmini, P., Giorgetti, E., Cristofani, R., Carra, S., Pennuto, M., & Poletti, A. (2013). Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 1–12.

Crippa, V., Carra, S., Rusmini, P., Sau, D., Bolzoni, E., Bendotti, C., De Biasi, S., & Poletti, A. (2010). A role of small heat shock protein B8 (HspB8) in the autophagic removal of misfolded proteins responsible for neurodegenerative diseases. *Autophagy*, *6*(7), 958–960.

Crippa, V., Sau, D., Rusmini, P., Boncoraglio, A., Onesto, E., Bolzoni, E., Galbiati, M., Fontana, E., Marino, M., Carra, S., Bendotti, C., de Biasi, S., & Poletti, A. (2010). The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Human Molecular Genetics*, *19*(17), 3440–3456.

## BIBLIOGRAPHIE

- Cudkovicz, M., McKenna-Yasek, D., Sapp, P., Chin, W., Geller, B., Hayden, D., Schoenfeld, D., Hosler, B., Horvitz, H., & Brown, R. (1997). Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *41*(2), 210–221.
- Cutler, R. G., Pedersen, W. A., Camandola, S., Rothstein, J. D., & Mattson, M. P. (2002). Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *52*(4), 448–457.
- D'Acunzo, P., Badaloni, A., Ferro, M., Ripamonti, M., Zimarino, V., Malgaroli, A., & Consalez, G. G. (2014). A conditional transgenic reporter of presynaptic terminals reveals novel features of the mouse corticospinal tract. *Frontiers in Neuroanatomy*, *7*(50), 1–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24431991>
- D'Amico, E., Pasmantier, M., Lee, Y.-W., Weimer, L., & Mitsumoto, H. (2013). Clinical evolution of pure upper motor neuron disease/dysfunction (PUMMD). *Muscle and Nerve*, *47*(1), 28–32.
- Dadon-Nachum, M., Melamed, E., & Offen, D. (2011). The dying-back phenomenon of motor neurons in ALS. *Journal of Molecular Neuroscience*, *43*(3), 470–477.
- Dal Canto, M. C., & Gurney, M. E. (1994). Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *The American Journal of Pathology*, *145*(6), 1271–1279.
- Damiano, M., Starkov, A. A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M., & Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca<sup>2+</sup> capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *Journal of Neurochemistry*, *96*(5), 1349–1361.
- Datta, A. K., & Stephens, J. A. (1990). Synchronization of motor unit activity during voluntary contraction in man. *The Journal of Physiology*, *422*, 397–419.
- Datta, S., Malhotra, L., Dickerson, R., Chaffee, S., Sen, C. K., & Roy, S. (2015). Laser capture microdissection: big data from small samples. *Histology and Histopathology*, *30*(11), 1255–1269.
- Daube, J. R. (2000). Electrodiagnostic studies in amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders. *Muscle and Nerve*, *23*(10), 1488–1502.
- de Kort, E. J. M., Gribnau, A. A. M., van Aanholt, H. T. H., & Nieuwenhuys, R. (1985). On the development of the pyramidal tract in the rat. I. The morphology of the growth zone. *Anatomy and Embryology*, *172*(2), 195–204.
- De Oliveira, G. P., Alves, C. J., & Chadi, G. (2013). Early gene expression changes in spinal cord from SOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis animal model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 1–17.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I., Boeve, B., Boxer, A., Baker, M., Rutherford, N., Nicholson, A., Finch, N., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G., Karydas, A., Seeley, W., Josephs, K., Coppola, G., Geschwind, D., Wszolek, Z., Feldman, H., Knopman, D., Petersen, R., Miller, B., Dickson, D., Boylan, K., Graff-Radford, N., & Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, *72*(2), 245–256.
- DeLuca, G. C., Ebers, G. C., & Esiri, M. M. (2004). The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *30*(6), 576–584.
- Deng, A. H., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Hung, W., Getzoff, E. D., Hu, P., Herzfeldt, B., Raymond, P., Warner, C., Deng, G., Soriano, E., Smyth, C., Parge, H. E., Roses, A. D., Hallewell, R. A., Pericak-vance, M. A., Siddique, T., Deng, H., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W., Getzoff, E. D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R. P., Warner, C., Deng, G., Soriano, E., Smyth, C., Parge, H. E., Ahmed, A., Roses, A. D., Hallewell, R. A., Pericak-vance, M. A., & Siddique, T. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science*, *261*(5124), 1047–1051.
- Dimou, L., & Gallo, V. (2015). NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia*, *63*(8), 1429–1451.
- Dion, P. A., Daoud, H., & Rouleau, G. A. (2009). Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nature Reviews Genetics*, *10*(11), 769–782.
- Drachman, D. B., Frank, K., Dykes-Hoberg, M., Teismann, P., Almer, G., Przedborski, S., & Rothstein, J. D. (2002). Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Annals of Neurology*, *52*(6), 771–778.
- Dugas, J. C., Mandemakers, W., Rogers, M., Ibrahim, A., Daneman, R., & Barres, B. A. (2008). A novel purification method for CNS projection neurons leads to the identification of brain vascular cells as a source of trophic support for corticospinal motor neurons. *Journal of Neuroscience*, *28*(33), 8294–8305.
- Dupuis, L., de Tapia, M., René, F., Lutz-Bucher, B., Gordon, J. W., Mercken, L., Pradier, L., & Loeffler, J.-P. (2000). Differential screening of mutated SOD1 transgenic mice reveals early up-regulation of a fast axonal transport component in spinal cord motor neurons. *Neurobiology of Disease*, *7*(4), 274–285.
- Dupuis, L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Oudart, H., Pradat, P., Meininger, V., & Loeffler, J. (2003). Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB Journal*, *17*(14), 2091–2093.
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Pradat, P., Lacomblez, L., Seihlan, D., Prinjha, R., Walsh, F., Meininger, V., & Loeffler, J. (2002). Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, *10*(3), 358–365.

## BIBLIOGRAPHIE

- Dupuis, L., Oudart, H., René, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., & Loeffler, J.-P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(30), 11159–11164.
- Dupuis, L., Pradat, P.-F., Ludolph, A. C., & Loeffler, J.-P. (2011). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet. Neurology*, *10*(1), 75–82.
- Eisen, A. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis-evolutionary and other perspectives. *Muscle and Nerve*, *40*(2), 297–304.
- Eisen, A., Braak, H., Tredici, K. Del, Lemon, R., Ludolph, A. C., & Kiernan, M. C. (2017). Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *0*, 1–8.
- Eisen, A., Kim, S., & Pant, B. (1992). Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle and Nerve*, *15*(2), 219–224.
- Eisen, A., Turner, M. R., & Lemon, R. (2014). Tools and talk: an evolutionary perspective on the functional deficits associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, *49*(4), 469–477.
- Eisen, A., & Weber, M. (2001). The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, *24*(4), 564–573.
- Elroy-Stein, O., Bernstein, Y., & Groner, Y. (1986). Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *The EMBO Journal*, *5*(3), 615–622. Retrieved from 11
- Esmaceli, M. A., Panahi, M., Yadav, S., Hennings, L., & Kiaei, M. (2013). Premature death of TDP-43 (A315T) transgenic mice due to gastrointestinal complications prior to development of full neurological symptoms of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Experimental Pathology*, *94*(1), 56–64.
- Ezzi, S. A., Urushitani, M., & Julien, J. P. (2007). Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *Journal of Neurochemistry*, *102*(1), 170–178.
- Faes, L., & Callewaert, G. (2011). Mitochondrial dysfunction in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *43*(6), 587–592.
- Fame, R., MacDonald, J., & Macklis, J. (2011). Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. *Trends in Neurosciences*, *34*(1), 41–50.
- Farrawell, N. E., Lambert-Smith, I. A., Warraich, S. T., Blair, I. P., Saunders, D. N., Hatters, D. M., & Yerbury, J. J. (2015). Distinct partitioning of ALS associated TDP-43, FUS and SOD1 mutants into cellular inclusions. *Scientific Reports*, *5*, 1–14.
- Feldman, E. L., Boulis, N. M., Hur, J., Johe, K., Rutkove, S. B., Federici, T., Polak, M., Bordeau, J., Sakowski, S. A., & Glass, J. D. (2014). Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: phase I trial outcomes. *Annals of Neurology*, *75*(3), 363–373.
- Fendrick, S. E., Xue, Q.-S., & Streit, W. J. (2007). Formation of multinucleated giant cells and microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Journal of Neuroinflammation*, *4*, 1–12.
- Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., Nerbonne, J. M., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, *28*(1), 41–51.
- Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M., & Shaw, P. J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, *7*(11), 616–630.
- Fink, J. K. (2001). Progressive spastic paraparesis: Hereditary spastic paraplegia and its relation to primary and amyotrophic lateral sclerosis. *Seminars in Neurology*, *21*(2), 199–207.
- Fink, J. K. (2013). Hereditary spastic paraplegia: Clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathologica*, *126*(3), 307–328.
- Fink, J. K. (2014). Hereditary spastic paraplegia: clinical principles and genetic advances. *Seminars in Neurology*, *34*(3), 293–305.
- Finsterer, J., Löscher, W., Quasthoff, S., Wanschitz, J., Auer-Grumbach, M., & Stevanin, G. (2012). Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *Journal of the Neurological Sciences*, *318*(1–2), 1–18.
- Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M. A., & Glass, J. D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental Neurology*, *185*(2), 232–240.
- Floyd, A. G., Yu, Q. P., Piboolnurak, P., Tang, M. X., Fang, Y., Smith, W. A., Yim, J., Rowland, L. P., Mitsumoto, H., & Pullman, S. L. (2009). Transcranial magnetic stimulation in ALS: utility of central motor conduction tests. *Neurology*, *72*(6), 498–504.
- Fogarty, M. J., Mu, E. W. H., Noakes, P. G., Lavidis, N. A., & Bellingham, M. C. (2016). Marked changes in dendritic structure and spine density precede significant neuronal death in vulnerable cortical pyramidal neuron populations in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1), 1–21.
- Fogarty, M. J., Noakes, P. G., & Bellingham, M. C. (2015). Motor cortex layer V pyramidal neurons exhibit dendritic regression, spine loss, and increased synaptic excitation in the presymptomatic hSOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, *35*(2), 643–647.
- Foran, E., & Trotti, D. (2009). Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, *11*(7), 1587–1602.

## BIBLIOGRAPHIE

- Fukuda, Y., Kawano, Y., Tanikawa, Y., Oba, M., Koyama, M., Takagi, H., Matsumoto, M., Nagayama, K., & Setou, M. (2006). In vivo imaging of the dendritic arbors of layer V pyramidal cells in the cerebral cortex using a laser scanning microscope with a stick-type objective lens. *Neuroscience Letters*, 400(1–2), 53–57.
- Fulton, J. F. (1935). A note on the definition of the motor and premotor areas. *Brain*, 58(2), 311–316.
- Fumagalli, E., Funicello, M., Rauen, T., Gobbi, M., & Mennini, T. (2008). Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *European Journal of Pharmacology*, 578(2–3), 171–176.
- Gal, J., Strö M, A.-L., Kilty, R., Zhang, F., & Zhu, H. (2007). p62 accumulates and enhances aggregate formation in model systems of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11068–11077.
- Galea, M. P., & Darian-Smith, I. (1994). Multiple corticospinal neuron populations in the macaque monkey are specified by their unique cortical origins, spinal terminations, and connections. *Cerebral Cortex*, 4(2), 166–194.
- Gamez, J., Corbera-Bellalta, M., Nogales, G., Ragner, N., García-Arumí, E., Badia-Canto, M., Lladó-Carbó, E., & Álvarez-Sabin, J. (2006). Mutational analysis of the Cu/Zn superoxide dismutase gene in a Catalan ALS population: should all sporadic ALS cases also be screened for SOD1? *Journal of the Neurological Sciences*, 247(1), 21–28.
- Geevasinga, N., Menon, P., Nicholson, G. A., Ng, K., Howells, J., Kril, J. J., Yiannikas, C., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2015). Cortical function in asymptomatic carriers and patients with C9orf72 amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurology*, 72(11), 1268–1274.
- Geevasinga, N., Menon, P., Özdinler, P. H., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2016). Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nature Reviews. Neurology*, 12(11), 651–661.
- Geevasinga, N., Menon, P., Sue, C. M., Kumar, K. R., Ng, K., Yiannikas, C., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2015). Cortical excitability changes distinguish the motor neuron disease phenotypes from hereditary spastic paraplegia. *European Journal of Neurology*, 22(5), 826–831.
- Geiss, G. K., Bumgarner, R. E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D. L., Fell, H. P., Ferree, S., George, R. D., Grogan, T., James, J. J., Maysuria, M., Mitton, J. D., Oliveri, P., Osborn, J. L., Peng, T., Ratcliffe, A. L., Webster, P. J., Davidson, E. H., Hood, L., & Dimitrov, K. (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature Biotechnology*, 26(3), 317–325.
- Ghasemi, M., & Brown, R. H. (2017). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1–38.
- Ghez, C., & Kubota, K. (1977). Activity of red nucleus neurons associated with a skilled forelimb movement in the cat. *Brain Research*, 131(2), 383–388.
- Gianino, S., Stein, S. A., Li, H., Lu, X., Biesiada, E., Ulas, J., & Xu, X. M. (1999). Postnatal growth of corticospinal axons in the spinal cord of developing mice. *Developmental Brain Research*, 112(2), 189–204.
- Gibson, A. R., Houk, J. C., & Kohlerman, N. J. (1985). Magnocellular red nucleus activity during different types of limb movement in the macaque monkey. *The Journal of Physiology*, 358, 527–549.
- Gong, Y. H., Parsadanian, A. S., Andreeva, A., Snider, W. D., & Elliott, J. L. (2000). Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 20(2), 660–665.
- Gordon, P. H., Cheng, B., Katz, I. B., Mitsumoto, H., & Rowland, L. (2009). Clinical features that distinguish PLS, upper motor neuron – dominant ALS, and typical ALS. *Neurology*, 72(22), 1948–1952.
- Gordon, P. H., Cheng, B., Katz, I. B., Pinto, M., Hays, A. P., Mitsumoto, H., & Rowland, L. P. (2006). The natural history of primary lateral sclerosis. *Neurology*, 66(5), 647–653.
- Govek, E., Newey, S., & Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes and Development*, 19(1), 1–49.
- Gowers, W. R. (1888). A manual of diseases of the nervous system, Volume 2. *The American Journal of Psychology*, 1(2), 346–347.
- Graziano, M. S. A., Taylor, C. S. R., Moore, T., & Cooke, D. F. (2002). The cortical control of movement revisited. *Neuron*, 36(3), 349–362.
- Grosskreutz, J., Van Den Bosch, L., & Keller, B. U. (2010). Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium*, 47(2), 165–174.
- Grunbaum, A. S. F., & Sherrington, C. S. (1901). Observations on the physiology of the cerebral cortex of some of the higher apes. *Proceedings of the Royal Society of London*, 69, 206–209.
- Gruzman, A., Wood, W. L., Alpert, E., Prasad, M. D., Miller, R. G., Rothstein, J. D., Bowser, R., Hamilton, R., Wood, T. D., Cleveland, D. W., Lingappa, V. R., & Liu, J. (2007). Common molecular signature in SOD1 for both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30), 12524–12529.
- Guégan, C., Vila, M., Rosoklija, G., Hays, A. P., & Przedborski, S. (2001). Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6569–6576.
- Guez-Barber, D., Fanous, S., Harvey, B. K., Zhang, Y., Lehrmann, E., Becker, K. G., Picciotto, M. R., & Hope, B. T. (2012). FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 203(1), 10–18.

## BIBLIOGRAPHIE

- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R. L., & Siddique, T. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science (New York, N.Y.)*, *264*(5166), 1772–1775.
- Hains, B. C., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2003). Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury. *The Journal of Comparative Neurology*, *462*(3), 328–341.
- Halter, B., Gonzalez de Aguilar, J. L., Rene, F., Petri, S., Fricker, B., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Larmet, Y., & Loeffler, J. P. (2010). Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, *48*(7), 915–923.
- Hammer, R. P., Tomiyasu, U., & Scheibel, A. B. (1979). Degeneration of the human Betz cell due to amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, *63*(2), 336–346.
- Hand, C., & Rouleau, G. (2002). Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, *25*(2), 135–159.
- Harding, A. E. (1993). Hereditary spastic paraplegias. *Seminars in Neurology*, *13*(4), 333–336.
- Hayward, L. J., Rodriguez, J. A., Kim, J. W., Tiwari, A., Goto, J. J., Cabelli, D. E., Valentine, J. S., & Brown, R. H. (2002). Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(18), 15923–15931.
- Heath, P. R., Kirby, J., & Shaw, P. J. (2013). Investigating cell death mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis using transcriptomics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 1–10.
- Heath, P. R., & Shaw, P. J. (2002). Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, *26*(4), 438–458.
- Heckman, C. J., & Enoka, R. M. (2012). Motor unit. *Comprehensive Physiology*, *2*(4), 2629–2682.
- Hedera, P., Eldevik, O. P., Maly, P., Rainier, S., & Fink, J. K. (2005). Spinal cord magnetic resonance imaging in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neuroradiology*, *47*(10), 730–734.
- Heiman-Patterson, T. D., Sher, R. B., Blankenhorn, E. A., Alexander, G., Deitch, J. S., Kunst, C. B., Maragakis, N., & 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*, *12*(2), 79–86.
- Heiman, M., Kulicke, R., Fenster, R. J., Greengard, P., & Heintz, N. (2014). Cell type-specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP). *Nature Protocols*, *9*(6), 1282–1291.
- Helbig, I. (2015). Genetic causes of generalized epilepsies. *Seminars in Neurology*, *35*(3), 288–292.
- Hempel, C. M., Sugino, K., & Nelson, S. B. (2007). A manual method for the purification of fluorescently labeled neurons from the mammalian brain. *Nature Protocols*, *2*(11), 2924–2929.
- Henkel, J. S., Beers, D. R., Siklós, L., & Appel, S. H. (2006). The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *31*(3), 427–437.
- Henkel, J. S., Beers, D. R., Wen, S., Bowser, R., & Appel, S. H. (2009). Decreased mRNA expression of tight junction proteins in lumbar spinal cords of patients with ALS. *Neurology*, *72*(18), 1614–1616.
- Henkel, J. S., Engelhardt, J. I., Siklos, L., Simpson, E. P., Kim, S. H., Pan, T., Goodman, J. C., Siddique, T., Beers, D. R., & Appel, S. H. (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Annals of Neurology*, *55*(2), 221–235.
- Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D. A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., D'Ambra, E., Huebeker, M., Hussain, G., Boursier-Neyret, C., Echaniz-Laguna, A., Ludolph, A. C., Platt, F. M., Walther, B., Spedding, M., Loeffler, J. P., & Gonzalez De Aguilar, J. L. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. *Human Molecular Genetics*, *24*(25), 7390–7405.
- Henriques, A., Kastner, S., Chatzikonstantinou, E., Pitzer, C., Plaas, C., Kirsch, F., Wafzig, O., Krüger, C., Spoelgen, R., Gonzalez De Aguilar, J.-L., Gretz, N., & Schneider, A. (2015). Gene expression changes in spinal motoneurons of the SOD1(G93A) transgenic model for ALS after treatment with G-CSF. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 1–12.
- Hensley, K., Fedynyshyn, J., Ferrell, S., Floyd, R. A., Gordon, B., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q. N., Stewart, C., West, M., West, S., & Williamson, K. S. (2003). Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, *14*(1), 74–80.
- Herdewyn, S., Cirillo, C., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., Vanden Berghe, P., & Van Damme, P. (2014). Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43 (A315T) mice. *Molecular Neurodegeneration*, *9*, 1–14.
- Hirano, A., Nakano, I., Kurland, L., Mulder, D., Holley, P., & Saccomanno, G. (1984). Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *43*(5), 471–480.
- Hirota, N., Eisen, A., & Weber, M. (2000). Complex fasciculations and their origin in amyotrophic lateral sclerosis and Kennedy's disease. *Muscle and Nerve*, *23*(12), 1872–1875.
- Hossaini, M., Cardona Cano, S., Van Dis, V., Haasdijk, E. D., Hoogenraad, C. C., Holstege, J. C., & Jaarsma, D. (2011). Spinal

## BIBLIOGRAPHIE

- inhibitory interneuron pathology follows motor neuron degeneration independent of glial mutant superoxide dismutase 1 expression in SOD1-ALS mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(8), 667–677.
- Houk, J., Gibson, A., Harvey, C., Kennedy, P., & van Kan, P. (1988). Activity of primate magnocellular red nucleus related to hand and finger movements. *Behavioural Brain Research*, 28(1–2), 201–206.
- Howland, D. S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N. J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., DeGennaro, L. J., Cleveland, D. W., & Rothstein, J. D. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1604–1609.
- Hsu, J. Y. C., Stein, S. A., & Xu, X. M. (2006). Development of the corticospinal tract in the mouse spinal cord: a quantitative ultrastructural analysis. *Brain Research*, 1084(1), 16–27.
- Huett, A., Ng, A., Cao, Z., Kuballa, P., Komatsu, M., Daly, M., Podolsky, D., & Xavier, R. (2009). A novel hybrid yeast-human network analysis reveals an essential role for FBNP1L in antibacterial autophagy. *Journal of Immunology*, 182(8), 4917–4930.
- Humphrey, D. R., Gold, R., & Reed, D. J. (1984). Sizes, laminar and topographic origins of cortical projections to the major divisions of the red nucleus in the monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 225(1), 75–94.
- Ilieva, H., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *Journal of Cell Biology*, 187(6), 761–772.
- Ince, P. G., & Wharton, S. B. (2007). Cytopathology of the motor neuron. *Handbook of Clinical Neurophysiology*, 82, 89–119.
- Ishigaki, S., Liang, Y., Yamamoto, M., Niwa, J., Ando, Y., Yoshihara, T., Takeuchi, H., Doyu, M., & Sobue, G. (2002). X-linked inhibitor of apoptosis protein is involved in mutant SOD1-mediated neuronal degeneration. *Journal of Neurochemistry*, 82(3), 576–584.
- Isom, L. L. (2001). Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *The Neuroscientist*, 7(1), 42–54.
- Iwatsubo, T., Kuzuhara, S., Kanemitsu, A., Shimada, H., & Toyokura, Y. (1990). Corticofugal projections to the motor nuclei of the brainstem and spinal cord in humans. *Neurology*, 40(2), 309–312.
- Jaarsma, D., Rognoni, F., van Duijn, W., Verspaget, H. W., Haasdijk, E. D., & Holstege, J. C. (2001). CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathologica*, 102(4), 293–305.
- Jara, J., Genç, B., Stanford, M., Pytel, P., Roos, R., Weintraub, S., Mesulam, M., Bigio, E., Miller, R., & Özdinler, P. (2017). Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 1–20.
- Jara, J., Villa, S., Khan, N., Bohn, M., & Ozdinler, P. (2012). AAV2 mediated retrograde transduction of corticospinal motor neurons reveals initial and selective apical dendrite degeneration in ALS. *Neurobiology of Disease*, 47(2), 174–183.
- Jiang, Y.-M., Yamamoto, M., Kobayashi, Y., Yoshihara, T., Liang, Y., Terao, S., Takeuchi, H., Ishigaki, S., Katsuno, M., Adachi, H., Niwa, J., Tanaka, F., Doyu, M., Yoshida, M., Hashizume, Y., & Sobue, G. (2005). Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 57(2), 236–251.
- Joensen, P. (2012). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the Faroe Islands. *Acta Neurologica Scandinavica*, 126(1), 62–66.
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Dimou, L., Lin, S., Fergani, A., Ruegg, M. a, Schwab, M. E., Dupuis, L., & Loeffler, J.-P. (2006). The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Reports*, 7(11), 1162–1167.
- Jones, E. G., Schreyer, D. J., & Wise, S. P. (1982). Growth and maturation of the rat corticospinal tract. *Progress in Brain Research*, 57, 361–379.
- Joyce, N. C., & Carter, G. T. (2013). Electrodiagnosis in persons with amyotrophic lateral sclerosis. *PM and R*, 5(5 SUPPL.), S89–S95.
- Junger, H., & Junger, W. G. (1998). CNTF and GDNF, but not NT-4, support corticospinal motor neuron growth via direct mechanisms. *Neuroreport*, 9(16), 3749–3754.
- Kabashi, E., Agar, J. N., Taylor, D. M., Minotti, S., & Durham, H. D. (2004). Focal dysfunction of the proteasome: A pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 89(6), 1325–1335.
- Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B. J., Velde, C. Vande, Bouchard, J.-P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P.-F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N., & Rouleau, G. A. (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 40(5), 572–574.
- Kamiyama, T., Kameda, H., Murabe, N., Fukuda, S., Yoshioka, N., Mizukami, H., Ozawa, K., & Sakurai, M. (2015). Corticospinal tract development and spinal cord innervation differ between cervical and lumbar targets. *Journal of Neuroscience*, 35(3), 1181–1191.
- Kamiyama, T., Yoshioka, N., & Sakurai, M. (2006). Synapse elimination in the corticospinal projection during the early postnatal period. *Journal of Neurophysiology*, 95(4), 2304–2313.
- Kamme, F., Salunga, R., Yu, J., Tran, D.-T., Zhu, J., Luo, L., Bittner, A., Guo, H.-Q., Miller, N., Wan, J., & Erlander, M. (2003). Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity. *Journal of Neuroscience*, 23(9), 3607–3615.



## BIBLIOGRAPHIE

- Kandel, E. ., Schwartz, J. H., Jessell, T. ., Siegelbaum, S. ., & Hudspeth, A. J. (2012). *Principles of neural science, fifth edition*. (McGraw-Hill Education, Ed.).
- Kang, S. H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D. W., Ostrow, L. W., Rothstein, J. D., & Bergles, D. E. (2013b). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, *16*(5), 571–579.
- Kassubek, J., Müller, H. P., Del Tredici, K., Brettschneider, J., Pinkhardt, E. H., Lulé, D., Böhm, S., Braak, H., & Ludolph, A. C. (2014). Diffusion tensor imaging analysis of sequential spreading of disease in amyotrophic lateral sclerosis confirms patterns of TDP-43 pathology. *Brain*, *137*(6), 1733–1740.
- Katz, L. C., & Iarovici, D. M. (1990). Green fluorescent latex microspheres: a new retrograde tracer. *Neuroscience*, *34*(2), 511–520.
- Kaufman, R. J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *110*(10), 1389–1398.
- Kawahara, Y., Ito, K., Sun, H., Aizawa, H., Kanazawa, I., & Kwak, S. (2004). Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature*, *427*(6977), 801.
- 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.
- Keller, A. F., Gravel, M., & Kriz, J. (2009). Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in schwann cells. *Glia*, *57*(10), 1130–1142.
- Kieran, D., Woods, I., Villunger, A., Strasser, A., & Prehn, J. H. M. (2007). Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(51), 20606–20611.
- Kiernan, J. A., & Hudson, A. J. (1991). Changes in size of cortical and lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, *114*(2), 843–853.
- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J. R., & Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, *377*(9769), 942–955.
- Kikuchi, H., Almer, G., Yamashita, S., Guegan, C., Nagai, M., Xu, Z., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., & Przedborski, S. (2006). Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(15), 6025–6030.
- King, A. E., Woodhouse, A., Kirkcaldie, M. T. K., & Vickers, J. C. (2016). Excitotoxicity in ALS: overstimulation, or overreaction? *Experimental Neurology*, *275*(1), 162–171.
- Kiritani, T., Wickersham, I. R., Seung, H. S., & Shepherd, G. M. G. (2012). Hierarchical Connectivity and Connection-Specific Dynamics in the Corticospinal-Corticostriatal Microcircuit in Mouse Motor Cortex. *Journal of Neuroscience*, *32*(14), 4992–5001.
- Kirkinezos, I., Bacman, S., Hernandez, D., Oca-Cossio, J., Arias, L., Perez-Pinzon, M., Bradley, W., & Moraes, C. (2005). Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 Mice. *Journal of Neuroscience*, *25*(1), 164–172.
- Klivenyi, P., Ferrante, R., Matthews, R., Bogdanov, M., Klein, A., Andreassen, O., Mueller, G., Wermer, M., Kaddurah-Daouk, R., & Beal, M. (1999). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Medicine*, *5*(3), 347–350.
- Kolset, S. O., & Salmivirta, M. (1999). Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *56*(9–10), 857–870.
- Kong, J., & Xu, Z. (1998). Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *Journal of Neuroscience*, *18*(9), 3241–3250.
- Koppers, M., Blokhuis, A. M., Westeneng, H. J., Terpstra, M. L., Zundel, C. A. C., Vieira De Sá, R., Schellevis, R. D., Waite, A. J., Blake, D. J., Veldink, J. H., Van Den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. (2015). C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Annals of Neurology*, *78*(3), 426–438.
- Körner, S., Bösel, S., Wichmann, K., Thau-Habermann, N., Zapf, A., Knippenberg, S., Dengler, R., & Petri, S. (2016). The axon guidance protein semaphorin 3A is increased in the motor cortex of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 326–333.
- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R. A. M., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W. B., & Hevner, R. F. (2009). Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, *19*(10), 2439–2450.
- Krabbe, K., Nielsen, J. E., Fallentin, E., Fenger, K., & Herning, M. (1997). MRI of autosomal dominant pure spastic paraplegia. *Neuroradiology*, *39*(10), 724–727.
- Krarup, C. (2011). Lower motor neuron involvement examined by quantitative electromyography in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurophysiology*, *122*(2), 414–422.
- Kuhlman, S. J., & Huang, Z. J. (2008). High-resolution labeling and functional manipulation of specific neuron types in mouse brain by Cre-activated viral gene expression. *PLoS ONE*, *3*(4), e2005.

## BIBLIOGRAPHIE

- Kushner, P., Stephenson, D., & Wright, S. (1991). Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *50*(3), 263–277.
- Kuypers, H. (1958). Corticobulbar connexions to the pons and lower brain-stem in man: an anatomical study. *Brain*, *81*(3), 364–388.
- Kuypers, H. G. J. M. (1982). A new look at the organization of the motor system. *Progress in Brain Research*, *57*, 381–403.
- Kuypers, H. G. J. M., & Lawrence, D. G. (1967). Cortical projections to the red nucleus and the brain stem in the Rhesus monkey. *Brain Research*, *4*(2), 151–188.
- Kwak, S., Hideyama, T., Yamashita, T., & Aizawa, H. (2010). AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology*, *30*(2), 182–188.
- Kwan, H. C., MacKay, W. A., Murphy, J. T., & Wong, Y. C. (1978). Spatial organization of precentral cortex in awake primates. II. Motor outputs. *Journal of Neurophysiology*, *41*(5), 1120–1131.
- Kwan, J. Y., Meoded, A., Danielian, L. E., Wu, T., & Floeter, M. K. (2012). Structural imaging differences and longitudinal changes in primary lateral sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroImage: Clinical*, *2*, 151–160.
- Kwiatkowski, T. J., Bosco, D., Leclerc, A., Tamrazian, E., Vanderburg, C., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G., Hosler, B., Cortelli, P., de Jong, P., Yoshinaga, Y., Haines, J., Pericak-Vance, M., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P., Horvitz, H., Landers, J., & Brown, R. J. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, *323*(5918), 1205–1208.
- Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P. N., Guillet, P., Powe, L., Durrleman, S., Delumeau, J. C., & Meininger, V. (1996). A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. ALS/Riluzole study group-II. *Neurology*, *47*(6 Suppl 4), S242-250.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K. R., Vu, A. Q., Baughn, M., Huelga, S. C., Clutario, K. M., Ling, S.-C., Liang, T. Y., Mazur, C., Wancewicz, E., Kim, A. S., Watt, A., Freier, S., Hicks, G. G., Donohue, J. P., Shiue, L., Bennett, C. F., Ravits, J., Cleveland, D. W., & Yeo, G. W. (2012). Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nature Neuroscience*, *15*(11), 1488–1497.
- Laird, F. M., Farah, M. H., Ackerley, S., Hoke, A., Maragakis, N., Rothstein, J. D., Griffin, J., Price, D. L., Martin, L. J., & Wong, P. C. (2008). Motor neuron disease occurring in a mutant Dynactin mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking. *Journal of Neuroscience*, *28*(9), 1997–2005.
- Landers, J. E., Melki, J., Meininger, V., Glass, J. D., van den Berg, L. H., van Es, M. A., Sapp, P. C., van Vught, P. W. J., McKenna-Yasek, D. M., Blauw, H. M., Cho, T.-J., Polak, M., Shi, L., Wills, A.-M., Broom, W. J., Ticozzi, N., Silani, V., Ozoguz, A., Rodriguez-Leyva, I., Veldink, J. H., Ivinson, A. J., Saris, C. G. J., Hosler, B. A., Barnes-Nessa, A., Couture, N., Wokke, J. H. J., Kwiatkowski, T. J., Ophoff, R. A., Cronin, S., Hardiman, O., Diekstra, F. P., Leigh, P. N., Shaw, C. E., Simpson, C. L., Hansen, V. K., Powell, J. F., Corcia, P., Salachas, F., Heath, S., Galan, P., Georges, F., Horvitz, H. R., Lathrop, M., Purcell, S., Al-Chalabi, A., & Brown, R. H. (2009). Reduced expression of the kinesin-associated protein 3 (KIFAP3) gene increases survival in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(22), 9004–9009.
- Landouré, G., Zhu, P. P., Lourenço, C. M., Johnson, J. O., Toro, C., Bricceno, K. V., Rinaldi, C., Meilleur, K. G., Sangaré, M., Diallo, O., Pierson, T. M., Ishiura, H., Tsuji, S., Hein, N., Fink, J. K., Stoll, M., Nicholson, G., Gonzalez, M. A., Spezziani, F., Dürr, A., Stevanin, G., Biesecker, L. G., Accardi, J., Landis, D. M. D., Gahl, W. A., Traynor, B. J., Marques, W., Züchner, S., Blackstone, C., Fischbeck, K. H., & Burnett, B. G. (2013). Hereditary spastic paraplegia Type 43 (SPG43) is caused by mutation in C19orf12. *Human Mutation*, *34*(10), 1357–1360.
- Lassek, A. M., & Wheatley, M. D. (1945). The pyramidal tract. An enumeration of the large motor cells of area 4 and the axons in the pyramids of the chimpanzee. *Journal of Comparative Neurology*, *82*(3), 299–302.
- Lattante, S., Rouleau, G. A., & Kabashi, E. (2013). TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Human Mutation*, *34*(6), 812–826.
- le Verche, V., Ikiz, B., Jacquier, A., Przedborski, S., & Re, D. B. (2011). Glutamate pathway implication in amyotrophic lateral sclerosis: what is the signal in the noise? *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, *4*, 1–22.
- Lederer, C. W., Torrisi, A., Pantelidou, M., Santama, N., & Cavallaro, S. (2007). Pathways and genes differentially expressed in the motor cortex of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics*, *8*, 1–26.
- Lee, D. Y., Jeon, G. S., Shim, Y. M., Seong, S. Y., Lee, K. W., & Sung, J. J. (2015). Modulation of SOD1 subcellular localization by transfection with wild- or mutant-type SOD1 in primary neuron and astrocyte cultures from ALS mice. *Experimental Neurobiology*, *24*(3), 226–234.
- Lee, S., Kruglikov, I., Huang, Z. J., Fishell, G., & Rudy, B. (2013). A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nature Neuroscience*, *16*(11), 1662–1670.
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.-W., Pellerin, L., Magistretti, P. J., & Rothstein, J. D. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, *487*(7408), 443–448.
- Lefort, S., Tómm, C., Floyd Sarria, J. C., & Petersen, C. C. H. (2009). The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. *Neuron*, *61*(2), 301–316.
- Leichsenring, A., Linnartz, B., Zhu, X.-R., Lübbert, H., & Stichel, C. C. (2006). Ascending neuropathology in the CNS of a mutant

## BIBLIOGRAPHIE

- SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research*, 1096(1), 180–195.
- Leigh, P. N., Anderton, B. H., Dodson, A., Gallo, J. M., Swash, M., & Power, D. M. (1988). Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neuroscience Letters*, 93(2–3), 197–203.
- Lemon, R. N. (2008). Descending Pathways in Motor Control. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 195–218.
- Lemon, R. N., & Griffiths, J. (2005). Comparing the function of the corticospinal system in different species: Organizational differences for motor specialization? *Muscle and Nerve*, 32(3), 261–279.
- Levine, J. B., Kong, J., Nadler, M., & Xu, Z. (1999). Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia*, 28(3), 215–224.
- Leyton, A. S. F., & Sherrington, C. S. (1917). Observations on the excitable cortex of the chimpanzee, orang-utan, and gorilla. *Experimental Physiology*, 11(2), 135–222.
- Li, A., Zhang, X., & Le, W. (2008). Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy*, 4(3), 290–293.
- Li, M., Ona, V., Guégan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L., Olszewski, A., Stieg, P., Lee, J., Przedborski, S., & Friedlander, R. (2000). Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science*, 288(5464), 335–339.
- Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J., & Gitler, A. D. (2013). Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *Journal of Cell Biology*, 201(3), 361–372.
- Liang, H., Paxinos, G., & Watson, C. (2012). The red nucleus and the rubrospinal projection in the mouse. *Brain Structure and Function*, 217(2), 221–232.
- Lillo, P., & Hodges, J. R. (2009). Frontotemporal dementia and motor neurone disease: overlapping clinic-pathological disorders. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16(9), 1131–1135.
- Ling, S., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2013). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, 79(3), 416–438.
- Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P. A., Velde, C. Vande, Ward, C. M., Miller, T. M., Subramaniam, J. R., Rothstein, J. D., Marklund, S., Andersen, P. M., Brännström, T., Gredal, O., Wong, P. C., Williams, D. S., & Cleveland, D. W. (2004). Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron*, 43(1), 5–17.
- Liu, Y., Pattamatta, A., Zu, T., Reid, T., Bardhi, O., Borchelt, D. R., Yachnis, A. T., & Ranum, L. P. W. (2016). C9orf72 BAC mouse model with motor deficits and neurodegenerative features of ALS/FTD. *Neuron*, 90(3), 521–534.
- Lobo, M. K., Karsten, S. L., Gray, M., Geschwind, D. H., & Yang, X. W. (2006). FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains. *Nature Neuroscience*, 9(3), 443–452.
- Lodato, S., Molyneaux, B. J., Zuccaro, E., Goff, L. a, Chen, H.-H., Yuan, W., Meleski, A., Takahashi, E., Mahony, S., Rinn, J. L., Gifford, D. K., & Arlotta, P. (2014). Gene co-regulation by Fezf2 selects neurotransmitter identity and connectivity of corticospinal neurons. *Nature Neuroscience*, 17(8), 1046–1054.
- Logroscino, G., Traynor, B. J., Hardiman, O., Chio, A., Couratier, P., Mitchell, J. D., Swingler, R. J., & Beghi, E. (2008). Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(1), 6–11.
- Logroscino, G., Traynor, B. J., Hardiman, O., Chio, A., Mitchell, D., Swingler, R. J., Millul, A., Benn, E., & Beghi, E. (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 81(4), 385–390.
- Lomen-Hoerth, C., Anderson, T., & Miller, B. (2002). The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology*, 59(7), 1077–1079.
- Lübke, J., Egger, V., Sakmann, B., & Feldmeyer, D. (2000). Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *The Journal of Neuroscience*, 20(14), 5300–5311.
- Mackenzie, I. R. A., Ansorge, O., Strong, M., Bilbao, J., Zinman, L., Ang, L. C., Baker, M., Stewart, H., Eisen, A., Rademakers, R., & Neumann, M. (2011). Pathological heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations: two distinct patterns correlating with disease severity and mutation. *Acta Neuropathologica*, 122(1), 87–98.
- Mackenzie, I. R. A., Bigio, E. H., Ince, P. G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N. J., Kwong, L. K., Forman, M. S., Ravits, J., Stewart, H., Eisen, A., McClusky, L., Kretzschmar, H. A., Monoranu, C. M., Highley, J. R., Kirby, J., Siddique, T., Shaw, P. J., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of Neurology*, 61(5), 427–434.
- Mackenzie, I. R. A., Rademakers, R., & Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology*, 9(10), 995–1007.
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S., & Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature Neuroscience*, 13(1), 133–140.
- Majounie, E., Renton, A. E., Mok, K., Dopper, E. G. P., Waite, A., Rollinson, S., Chio, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., van Swieten, J. C., Abramzon, Y., Johnson, J. O., Sendtner, M., Pampillet, R., Orrell, R. W., Mead, S., Sidle, K. C., Houlden, H., Rohrer, J. D., Morrison, K. E., Pall, H., Talbot, K., Ansorge, O., Hernandez, D. G., Arepalli, S., Sabatelli, M., Mora, G., Corbo, M., Giannini, F., Calvo, A., Englund, E., Borghero, G., Floris, G. L., Remes, A. M., Laaksovirta, H., McCluskey, L.,

## BIBLIOGRAPHIE

- Trojanowski, J. Q., Van Deerlin, V. M., Schellenberg, G. D., Nalls, M. A., Drory, V. E., Lu, C. S., Yeh, T. H., Ishiura, H., Takahashi, Y., Tsuji, S., Le Ber, I., Brice, A., Drepper, C., Williams, N., Kirby, J., Shaw, P., Hardy, J., Tienari, P. J., Heutink, P., Morris, H. R., Pickering-Brown, S., & Traynor, B. J. (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *The Lancet Neurology*, *11*(4), 323–330.
- Mancuso, R., & Navarro, X. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Progress in Neurobiology*, *133*, 1–26.
- Mandemakers, W. (2014). Retrograde labeling of corticospinal motor neurons from early postnatal rodents. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2014*(4), 372–379.
- Marin, B., Desport, J. C., Kajeu, P., Jesus, P., Nicolaud, B., Nicol, M., Preux, P. M., & Couratier, P. (2011). Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *82*(6), 628–34.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(10), 793–807.
- Marsh, E. D., Minarcik, J., Campbell, K., Brooks-Kayal, A. R., & Golden, J. A. (2008). FACS-array gene expression analysis during early development of mouse telencephalic interneurons. *Developmental Neurobiology*, *68*(4), 434–445.
- Martin, E., Yanicostas, C., Rastetter, A., Naini, S. M. A., Maouedj, A., Kabashi, E., Rivaud-Péchoix, S., Brice, A., Stevanin, G., & Soussi-Yanicostas, N. (2012). Spatacsin and spastizin act in the same pathway required for proper spinal motor neuron axon outgrowth in zebrafish. *Neurobiology of Disease*, *48*(3), 299–308.
- Mathis, S., Couratier, P., Julian, A., Corcia, P., & Le Masson, G. (2017). Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regeneration Research*, *12*(2), 181–184.
- Matsumoto, S., Goto, S., Kusaka, H., Imai, T., Murakami, N., Hashizume, Y., Okazaki, H., & Hirano, A. (1993). Ubiquitin-positive inclusion in anterior horn cells in subgroups of motor neuron diseases: a comparative study of adult-onset amyotrophic lateral sclerosis, juvenile amyotrophic lateral sclerosis and werdnig-hoffmann disease. *Journal of the Neurological Sciences*, *115*(2), 208–213.
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C. D., Martushova, K., Kiaei, M., Flint Beal, M., & Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(33), 29626–29633.
- Matus, S., Valenzuela, V., Medinas, D. B., & Hetz, C. (2013). ER dysfunction and protein folding stress in ALS. *International Journal of Cell Biology*, *2013*, 1–12.
- Maximino, J. R., De Oliveira, G. P., Alves, C. J., Chadi, G., & Hermann, D. M. (2014). Deregulated expression of cytoskeleton related genes in the spinal cord and sciatic nerve of presymptomatic SOD1 G93A amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 1–18.
- McCall, A. A., Miller, D. M., & Yates, B. J. (2017). Descending influences on vestibulospinal and vestibulosympathetic reflexes. *Frontiers in Neurology*, *8*, 1–15.
- McConnell, S. K. (1991). The generation of neuronal diversity in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, *14*, 269–300.
- McDermott, C., White, K., Bushby, K., & Shaw, P. (2000). Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *69*(2), 150–160.
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2002). Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, *26*(4), 459–470.
- McKiernan, B. J., Marcario, J. K., Karrer, J. H., & Cheney, P. D. (1998). Corticomotoneuronal postspike effects in shoulder, elbow, wrist, digit, and intrinsic hand muscles during a reach and prehension task. *Journal of Neurophysiology*, *80*(4), 1961–1980.
- Meissner, F., Molawi, K., & Zychlinsky, A. (2010). Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1beta accelerates ALS pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(29), 13046–13050.
- Menon, P., Geevasinga, N., van den Bos, M., Yiannikas, C., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2017). Cortical hyperexcitability and disease spread in amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology*, *24*(6), 816–824.
- Menon, P., Geevasinga, N., Yiannikas, C., Howells, J., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2015). Sensitivity and specificity of threshold tracking transcranial magnetic stimulation for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: A prospective study. *The Lancet Neurology*, *14*(5), 478–484.
- Menon, P., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2014). Cortical dysfunction underlies the development of the split-hand in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, *9*(1), 1–9.
- Menon, P., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2015). Cortical hyperexcitability precedes lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clinical Neurophysiology*, *126*(4), 803–809.
- Mezzapesa, D. M., D'Errico, E., Tortelli, R., Distaso, E., Cortese, R., Tursi, M., Federico, F., Zoccolella, S., Logroscino, G., Dicuonzo, F., & Simone, I. L. (2013). Cortical thinning and clinical heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, *8*(11), 1–8.
- Middleton, F. A., & Strick, P. L. (2000). Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Research Reviews*,

## BIBLIOGRAPHIE

31(2–3), 236–250.

Millicamps, S., Boillée, S., Le Ber, I., Seilhean, D., Teyssou, E., Giraudeau, M., Moigneu, C., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Corcia, P., Pradat, P.-F., Le Forestier, N., Lacomblez, L., Bruneteau, G., Camu, W., Brice, A., Cazeneuve, C., Leguern, E., Meininger, V., & Salachas, F. (2012). Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes. *Journal of Medical Genetics*, 49(4), 258–263.

Millicamps, S., Salachas, F., Cazeneuve, C., Gordon, P., Bricka, B., Camuzat, A., Guillot-Noël, L., Russaouen, O., Bruneteau, G., Pradat, P.-F., Le Forestier, N., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Guy, N., Thauvin-Robinet, C., Lacomblez, L., Couratier, P., Hannequin, D., Seilhean, D., Le Ber, I., Corcia, P., Camu, W., Brice, A., Rouleau, G., LeGuern, E., & Meininger, V. (2010). SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype–phenotype correlations. *Journal of Medical Genetics*, 47(8), 554–560.

Miller, T. M., Pestronk, A., David, W., Rothstein, J., Simpson, E., Appel, S. H., Andres, P. L., Mahoney, K., Allred, P., Alexander, K., Ostrow, L. W., Schoenfeld, D., Macklin, E. A., Norris, D. A., Manousakis, G., Crisp, M., Smith, R., Bennett, C. F., Bishop, K. M., & Cudkovic, M. E. (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: A phase 1, randomised, first-in-man study. *The Lancet Neurology*, 12(5), 435–442.

Mills, K. R., & Nithi, K. A. (1997). Corticomotor threshold is reduced in early sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, 20(9), 1137–1141.

Mione, M. C., Cavanagh, J. F. R., Harris, B., & Parnavelas, J. G. (1997). Cell Fate Specification and Symmetrical / Asymmetrical Divisions in the Developing Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 17(6), 2018–2029.

Mitchell, B. D., & Macklis, J. D. (2005). Large-scale maintenance of dual projections by callosal and frontal cortical projection neurons in adult mice. *Journal of Comparative Neurology*, 482(1), 17–32.

Mitchell, J. D. (2000). Guidelines in motor neurone disease (MND)/amyotrophic lateral sclerosis (ALS)--from diagnosis to patient care. *Journal of Neurology*, 247, 7–12.

Mitsumoto, H., Nagy, P. L., Gennings, C., Murphy, J., Andrews, H., Goetz, R., Floeter, M. K., Hupf, J., Singleton, J., Barohn, R. J., Nations, S., Shoesmith, C., Kasarskis, E., & Factor-Litvak, P. (2015). Phenotypic and molecular analyses of primary lateral sclerosis. *Neurology. Genetics*, 1(1), 1–8.

Mitsumoto, H., Santella, R. M., Liu, X., Bogdanov, M., Zipprich, J., Wu, H.-C., Mahata, J., Kilty, M., Bednarz, K., Bell, D., Gordon, P. H., Hornig, M., Mehrazin, M., Naini, A., Flint Beal, M., & Factor-Litvak, P. (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 9(3), 177–183.

Miyoshi, G., & Fishell, G. (2006). Directing neuron-specific transgene expression in the mouse CNS. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(5), 577–584.

Mochizuki, Y., Mizutani, T., & Takasu, T. (1995). Amyotrophic lateral sclerosis with marked neurological asymmetry: clinicopathological study. *Acta Neuropathologica*, 90(1), 44–50.

Mok, K. Y., Koutsis, G., Schottlaender, L. V., Polke, J., Panas, M., & Houlden, H. (2012). High frequency of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat in familial and sporadic Greek ALS patients. *Neurobiology of Aging*, 33(8), 1851.e1-1851e5.

Molnar, Z., & Cheung, A. F. P. (2006). Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neuroscience Research*, 55(2), 105–115.

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Fame, R. M., Macdonald, J. L., Macquarrie, K. L., & Macklis, J. D. (2009). Novel subtype-specific genes identify distinct subpopulations of callosal projection neurons. *Journal of Neuroscience*, 29(39), 12343–12354.

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., & Macklis, J. D. (2005). Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron*, 47(6), 817–831.

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L., & Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 427–437.

Molyneaux, B. J., Goff, L. A., Brettler, A. C., Chen, H. H., Hrvatin, S., Rinn, J. L., & Arlotta, P. (2015). DeCoN: Genome-wide analysis of in vivo transcriptional dynamics during pyramidal neuron fate selection in neocortex. *Neuron*, 85(2), 275–288.

Moreno-López, Y., Olivares-Moreno, R., Cordero-Erausquin, M., & Rojas-Piloni, G. (2016). Sensorimotor integration by corticospinal system. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 1–6.

Mori, K., Weng, S., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., Schmid, B., Kretzschmar, H., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Haass, C., & Edbauer, D. (2013). The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science*, 339(6125), 1335–1338.

Morimoto, N., Nagai, M., Ohta, Y., Miyazaki, K., Kurata, T., Morimoto, M., Murakami, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Kamiya, T., & Abe, K. (2007). Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Research*, 1167, 112–117.

Morrison, B. M., Janssen, W. G., Gordon, J. W., & Morrison, J. H. (1998a). Time course of neuropathology in the spinal cord of G86R superoxide dismutase transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology*, 391(1), 64–77.

Morrison, B. M., Janssen, W. G. M., Gordon, J. W., & Morrison, J. H. (1998b). Light and electron microscopic distribution of the AMPA receptor subunit, GluR2, in the spinal cord of control and G86R mutant superoxide dismutase transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology*, 395(4), 523–534.

## BIBLIOGRAPHIE

- Muir, R. B., & Lemon, R. N. (1983). Corticospinal neurons with a special role in precision grip. *Brain Research*, 261(2), 312–316.
- Murray, E., & Coulter, J. (1981). Organization of corticospinal neurons in the monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 195(2), 339–365.
- Murray, H. M., & Haines, D. E. (1975). The Rubrospinal Tract in a Prosimian Primate, Galago senegalensis. *Brain, Behavior and Evolution*, 12(4–6), 311–333.
- Museth, A. K., Brorsson, A. C., Lundqvist, M., Tibell, L. A. E., & Jonsson, B. H. (2009). The ALS-associated mutation G93A in human copper-zinc superoxide dismutase selectively destabilizes the remote metal binding region. *Biochemistry*, 48(37), 8817–8829.
- Nagy, D., Kato, T., & Kushner, P. D. (1994). Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 38(3), 336–347.
- Namekawa, M., Ribai, P., Nelson, I., Forlani, S., Fellmann, F., Goizet, C., Depienne, C., Stevanin, G., Ruberg, M., Dürr, A., & Brice, A. (2006). SPG3A is the most frequent cause of hereditary spastic paraplegia with onset before age 10 years. *Neurology*, 66(1), 112–114.
- Nassif, M., Valenzuela, V., Rojas-Rivera, D., Vidal, R., Matus, S., Castillo, K., Fuentealba, Y., Kroemer, G., Levine, B., & Hetz, C. (2014). Pathogenic role of BECN1/Beclin 1 in the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy*, 10(7), 1256–1271.
- Nathan, P., & Smith, M. (1982). The rubrospinal and central tegmental tracts in man. *Brain*, 105(2), 223–269.
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130–133.
- Ng, L., Khan, F., Young, C., & Galea, M. (2017). Symptomatic treatments for amyotrophic lateral sclerosis / motor neuron disease ( Protocol ). *Cochrane Database Syst Rev*.
- Nguyen, M. D., Julien, J. P., & Rivest, S. (2001). Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1 $\beta$  in neurodegeneration. *Annals of Neurology*, 50(5), 630–639.
- Nihei, K., McKee, A. C., & Kowall, N. W. (1993). Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathologica*, 86(1), 55–64.
- Nikodemova, M., Small, A., Smith, S., Mitchell, G., & Watters, J. (2014). Spinal but not cortical microglia acquire an atypical phenotype with high VEGF, galectin-3 and osteopontin, and blunted inflammatory responses in ALS rats. *Neurobiology of Disease*, 69, 43–53.
- Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., & Ichijo, H. (2008). ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes and Development*, 22(11), 1451–1464.
- Nixon, R. (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *Journal of Cell Science*, 120, 4081–4091.
- Noctor, S., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience*, 7(2), 136–144.
- Nonneman, A., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2014). The role of oligodendroglial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Disease Management*, 4(3), 223–239.
- Novarino, G., Fenstermaker, A., Zaki, M., Hofree, M., Silhavy, J., Heiberg, A., Abdellateef, M., Rosti, B., Scott, E., Mansour, L., Masri, A., Kayserili, H., Al-Aama, J., Abdel-Salam, G., Karminejad, A., Kara, M., Kara, B., Bozorgmehri, B., Ben-Omran, T., Mojahedi, F., Mahmoud, I., Bouslam, N., Bouhouche, A., Benomar, A., Hanein, S., Raymond, L., Forlani, S., Mascaró, M., Selim, L., Shehata, N., Al-Allawi, N., Bindu, P., Azam, M., Gunel, M., Caglayan, A., Bilguvar, K., Tolun, A., Issa, M., Schroth, J., Spencer, E., Rosti, R., Akizu, N., Vaux, K., Johansen, A., Koh, A., Megahed, H., Durr, A., Brice, A., Stevanin, G., Gabriel, S., Ideker, T., & Gleeson, J. (2014). Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science*, 343(6170), 506–511.
- Nutini, M., Spalloni, A., Florenzano, F., Westenbroek, R. E., Marini, C., Catterall, W. A., Bernardi, G., & Longone, P. (2011). Increased expression of the beta3 subunit of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in the spinal cord of the SOD1G93A mouse. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 47(2), 108–118.
- Oginsky, M. F., Cui, N., Zhong, W., Johnson, C. M., & Jiang, C. (2017). Hyperexcitability of mesencephalic trigeminal neurons and reorganization of ion channel expression in a Rett syndrome model. *Journal of Cellular Physiology*, 232(5), 1151–1164.
- Okamoto, K., Hirai, S., Amari, M., Iizuka, T., Watanabe, M., Murakami, N., & Takatama, M. (1993). Oculomotor nuclear pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 85(5), 458–462.
- Okamoto, K., Mizuno, Y., & Fujita, Y. (2008). Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*, 28(2), 109–115.
- Olivares-Moreno, R., Moreno-Lopez, Y., Concha, L., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M., Cordero-Erausquin, M., & Rojas-Piloni, G. (2017). The rat corticospinal system is functionally and anatomically segregated. *Brain Structure and Function*, 1–14.
- Onodera, S., & Hicks, T. (2010). Carbocyanine dye usage in demarcating boundaries of the aged human red nucleus. *PLoS ONE*, 5(12), 1–11.
- Oray, S., Majewska, A., & Sur, M. (2004). Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix

## BIBLIOGRAPHIE

degradation. *Neuron*, 44(6), 1021–1030.

Orlacchio, A., Babalini, C., Borreca, A., Patrono, C., Massa, R., Basaran, S., Munhoz, R. P., Rogaeva, E. A., St George-Hyslop, P. H., Bernardi, G., & Kawarai, T. (2010). Spatacsin mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 133(2), 591–598.

Oswald, M. J., Tantirigama, M. L. S., Sonntag, I., Hughes, S. M., & Empson, R. M. (2013). Diversity of layer 5 projection neurons in the mouse motor cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 1–18.

Oyanagi, K., Yamazaki, M., Takahashi, H., Watabe, K., Wada, M., Komori, T., Morita, T., & Mizutani, T. (2008). Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34(6), 650–658.

Ozdinler, P. H., Benn, S., Yamamoto, T. H., Guzel, M., Brown, R. H., & Macklis, J. D. (2011). Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G93A transgenic ALS mice. *The Journal of Neuroscience*, 31(11), 4166–4177.

Özdinler, P. H., & Macklis, J. D. (2006). IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nature Neuroscience*, 9(11), 1371–1381.

Paganoni, S., Deng, J., Jaffa, M., Cudkovicz, M. E., & Wills, A.-M. (2011). Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 44(1), 20–24.

Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S. T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A.-L., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J.-P., & Renè, F. (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Molecular Medicine*, 7(5), 526–546.

Pamphlett, R., Kril, J., & Hng, T. M. (1995). Motor neuron disease: a primary disorder of corticomotoneurons? *Muscle and Nerve*, 18(3), 314–318.

Pantelidou, M., Zographos, S. E., Lederer, C. W., Kyriakides, T., Pfaffl, M. W., & Santama, N. (2007). Differential expression of molecular motors in the motor cortex of sporadic ALS. *Neurobiology of Disease*, 26(3), 577–589.

Park, M. C., Belhaj-Saf, A., Gordon, M., & Cheney, P. D. (2001). Consistent features in the forelimb representation of primary motor cortex in rhesus macaques. *The Journal of Neuroscience*, 21(8), 2784–2792.

Pasinelli, P., Belford, M. E., Lennon, N., Bacskai, B. J., Hyman, B. T., Trotti, D., & Brown, R. H. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron*, 43(1), 19–30.

Pasinelli, P., Borchelt, D. R., Houseweart, M. K., Cleveland, D. W., & Brown, R. H. (1998). Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15763–15768.

Pasinelli, P., Houseweart, M. K., Brown, R. H., & Cleveland, D. W. (2000). Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13901–13906.

Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates, sixth edition* (Hard Cover Edition).

Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J. S., Estévez, A. G., & Barbeito, L. (2004). Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 89(2), 464–473.

Penco, S., Lunetta, C., Mosca, L., Maestri, E., Avemaria, F., Tarlarini, C., Patrosso, M. C., Marocchi, A., & Corbo, M. (2011). Phenotypic heterogeneity in a SOD1 G93D Italian ALS family: an example of human model to study a complex disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 44(1), 25–30.

Penfield, W., & Boldrey, E. (1937). Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain*, 60, 389–443.

Penfield, W., & Rasmussen, T. (1952). *The Cerebral Cortex of Man*. New York: The Macmillan Company, 248.

Perrin, S. (2014). Make mouse studies work. *Nature*, 507, 423.

Perry, J. J. P., Shin, D. S., Getzoff, E. D., & Tainer, J. A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(2), 245–262.

Perry, T. L., Krieger, C., Hansen, S., & Eisen, A. (1990). Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Annals of Neurology*, 28(1), 12–17.

Petersen, N. C., Taylor, J. L., Murray, N. P. S., Gandevia, S. C., & Butler, J. E. (2011). Differential effects of low-intensity motor cortical stimulation on the inspiratory activity in scalene muscles during voluntary and involuntary breathing. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 175(2), 265–271.

Petri, S., Schmalbach, S., Grosskreutz, J., Krampfl, K., Grothe, C., Dengler, R., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., & Bufler, J. (2005). The cellular mRNA expression of GABA and glutamate receptors in spinal motor neurons of SOD1 mice. *Journal of the Neurological Sciences*, 238(1–2), 25–30.

Philips, T., Bento-Abreu, A., Nonneman, A., Haeck, W., Staats, K., Geelen, V., Hersmus, N., Küsters, B., Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Richardson, W. D., & Robberecht, W. (2013). Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral

## BIBLIOGRAPHIE

sclerosis. *Brain*, 136(2), 471–482.

Philips, T., & Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *The Lancet Neurology*, 10(3), 253–263.

Philips, T., & Rothstein, J. D. (2015). Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology*, 69, 1–21.

Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Mercuri, N. B., & Zona, C. (2009). Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 215(2), 368–379.

Poloni, M., Facchetti, D., Mai, R., Micheli, A., Agnoletti, L., Francolini, G., Mora, G., Camana, C., Mazzini, L., & Bachetti, T. (2000). Circulating levels of tumour necrosis factor- $\alpha$  and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 287(3), 211–214.

Polymenidou, M., Lagier-tourenne, C., Hutt, K. R., Huelga, S. C., Moran, J., Liang, T. Y., Ling, S.-C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., Kordasiewicz, H., Sedaghat, Y., Donohue, J. P., Shiue, L., Bennett, C. F., Yeo, G. W., & Cleveland, D. W. (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature Neuroscience*, 14(4), 459–468.

Pradat, P.-F., Kabashi, E., & Desnuelle, C. (2015). Deciphering spreading mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis: clinical evidence and potential molecular processes. *Current Opinion in Neurology*, 28(5), 455–461.

Praline, J., Guennoc, A.-M., Vourc'h, P., De Toffol, B., & Corcia, P. (2010). Primary lateral sclerosis may occur within familial amyotrophic lateral sclerosis pedigrees. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 11(1–2), 154–156.

Prentice, S. D., & Drew, T. (2001). Contributions of the reticulospinal system to the postural adjustments occurring during voluntary gait modifications. *Journal of Neurophysiology*, 85(2), 679–698.

Pringle, C., Hudson, A., Munoz, D., Kiernan, J., Brown, W., & Ebers, G. (1992). Primary lateral sclerosis. Clinical features, neuropathology and diagnostic criteria. *Brain*, 115(2), 495–520.

Puentes, F., Malaspina, A., Van Noort, J. M., & Amor, S. (2016). Non-neuronal cells in ALS: role of glial, immune cells and blood-CNS barriers. *Brain Pathology*, 26(2), 248–257.

Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L., & Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nature Neuroscience*, 9(3), 408–419.

Pupillo, E., Messina, P., Logroscino, G., & Beghi, E. (2014). Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: A population-based study. *Annals of Neurology*, 75(2), 287–297.

Purves, D., Augustine, G. ., Fitzpatrick, D., Hall, W. ., LaMantia, A.-S., McNamara, J. ., & White, L. . (2011). *Neurosciences* (De Boeck).

Rademakers, R., Stewart, H., DeJesus-Hernandez, M., Krieger, C., Graff-Radford, N., Fabros, M., Briemberg, H., Cashman, N., Eisen, A., & Mackenzie, I. R. A. (2010). Fus gene mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, 42(2), 170–176.

Rakhit, R., Cunningham, P., Furtos-Matei, A., Dahan, S., Qi, X. F., Crow, J. P., Cashman, N. R., Kondejewski, L. H., & Chakrabarty, A. (2002). Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47551–47556.

Rakic, P. (1988). Specification of cerebral cortical areas. *Science*, 241(4862), 170–176.

Ralph, G. S., Radcliffe, P. A., Day, D. M., Carthy, J. M., Leroux, M. A., Lee, D. C. P., Wong, L.-F., Bilsland, L. G., Greensmith, L., Kingsman, S. M., Mitrophanous, K. A., Mazarakis, N. D., & Azzouz, M. (2005). Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nature Medicine*, 11(4), 429–433.

Rathelot, J.-A., & Strick, P. L. (2006). Muscle representation in the macaque motor cortex: an anatomical perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21), 8257–8262.

Ravits, J. (2014). Focality, stochasticity and neuroanatomic propagation in ALS pathogenesis. *Experimental Neurology*, 262, 121–126.

Ravits, J., Laurie, P., Fan, Y., & Moore, D. H. (2007). Implications of ALS focality : rostral – caudal distribution of lower motor neuron loss postmortem. *Neurology*, 68(19), 1576–1582.

Ravits, J. M., & La Spada, A. R. (2009). ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology*, 73(10), 805–811.

Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. R., Wilcox, H. M., Flood, D. G., Beal, M. F., Brown, R. H., Scott, R. W., & 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), 43–47.

Régal, L., Vanopdenbosch, L., Tilkin, P., Van Den Bosch, L., Thijs, V., Sciot, R., & Robberecht, W. (2006). The G93C mutation in superoxide dismutase 1: clinicopathologic phenotype and prognosis. *Archives of Neurology*, 63(2), 262–267.

Reid, C. S., & Serrien, D. J. (2012). Handedness and the excitability of cortical inhibitory circuits. *Behavioural Brain Research*, 230(1), 144–148.

Renton, A. E., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature Neuroscience*, 17(1),



17–23.

- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A. M., Kaganovich, A., Scholz, S. W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D. W., Hernandez, D. G., Johnson, J. O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R. J., Orrell, R. W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I. E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J. B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M. A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V. M., Kaivorinne, A. L., Holtta-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chio, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J. D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E. E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S. D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N. M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H. R., Tienari, P. J., & Traynor, B. J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, *72*(2), 257–268.
- Riddle, C. N., Edgley, S. A., & Baker, S. N. (2009). Direct and indirect connections with upper limb motoneurons from the primate reticulospinal tract. *Journal of Neuroscience*, *29*(15), 4993–4999.
- 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), 586–590.
- Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H., & Gordon, J. W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(3), 689–693.
- Rivara, C.-B., Sherwood, C. C., Bouras, C., & Hof, P. R. (2003). Stereologic characterization and spatial distribution patterns of Betz cells in the human primary motor cortex. *The Anatomical Record*, *270*(2), 137–151.
- Riviere, M., Meininger, V., Zeisser, P., & Munsat, T. (1998). An analysis of extended survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis treated with riluzole. *Archives of Neurology*, *55*(4), 526–528.
- Robberecht, W., Aguirre, T., Van den Bosch, L., Tilkin, P., Cassiman, J., & Matthijs, G. (1996). D90A heterozygosity in the SOD1 gene is associated with familial and apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, *47*(5), 1336–1339.
- Robberecht, W., & Philips, T. (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews. Neuroscience*, *14*(4), 248–264.
- Roland, P. E., Larsen, B., Lassen, N. A., & Skinhoj, E. (1980). Supplementary motor area and other cortical areas in organization of voluntary movements in man. *Journal of Neurophysiology*, *43*(1), 118–136.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D. W., Smyth, C., Laing, N. G., Soriano, E., Pericak-Vance, M. A., Haines, J., Rouleau, G. A., Gusella, J. S., Horvitz, R. H., & Brown Jr, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, *362*(6415), 59–62.
- Rosenzweig, E. S., Brock, J. H., Culbertson, M. D., Lu, P., Moseanko, R., Edgerton, V. R., Havton, L. A., & Tuszyński, M. H. (2009). Extensive spinal decussation and bilateral termination of cervical corticospinal projections in rhesus monkeys. *Journal of Comparative Neurology*, *513*(2), 151–163.
- Rouaux, C., & Arlotta, P. (2010). Fezf2 directs the differentiation of corticofugal neurons from striatal progenitors in vivo. *Nature Neuroscience*, *13*(11), 1345–1347. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2658>
- Rouaux, C., & Arlotta, P. (2013). Direct lineage reprogramming of post-mitotic callosal neurons into corticofugal neurons in vivo. *Nature Cell Biology*, *15*(2), 214–221.
- Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Menger, Y., Boutillier, A.-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. *Journal of Neuroscience*, *27*(21), 5535–5545.
- Rowland, L., & Shneider, N. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, *344*(22), 1688–1700.
- Rubio-Garrido, P., Pérez-De-Manzo, F., Porrero, C., Galazo, M. J., & Clascá, F. (2009). Thalamic input to distal apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent. *Cerebral Cortex*, *19*(10), 2380–2395.
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., & Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Developmental Neurobiology*, *71*(1), 45–61.
- Saba, L., Viscomi, M. T., Caioli, S., Pignataro, A., Bisicchia, E., Pieri, M., Molinari, M., Ammassari-Teule, M., & Zona, C. (2015). Altered functionality, morphology, and vesicular glutamate transporter expression of cortical motor neurons from a presymptomatic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cerebral Cortex*, *26*(4), 1512–1528.
- Sabatelli, M., Madia, F., Conte, A., Luigetti, M., Zollino, M., Mancuso, I., Lo Monaco, M., Lippi, G., & Tonali, P. (2008). Natural history of young-adult amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, *71*(12), 876–881.
- Saberi, S., Stauffer, J. E., Schulte, D. J., & Ravits, J. (2015). Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis and its variants. *Neurologic Clinics*, *33*(4), 855–876.
- Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A., & Warner, T. T. (2008). Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *The Lancet Neurology*, *7*(12), 1127–1138.

## BIBLIOGRAPHIE

- Sanelli, T., Ge, W., Leystra-Lantz, C., & Strong, M. J. (2007). Calcium mediated excitotoxicity in neurofilament aggregate-bearing neurons in vitro is NMDA receptor dependant. *Journal of the Neurological Sciences*, 256(1–2), 39–51.
- Sanz, E., Yang, L., Su, T., Morris, D. R., McKnight, G. S., & Amieux, P. S. (2009). Cell-type-specific isolation of ribosome-associated mRNA from complex tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13939–13944.
- Sarlette, A., Krampfl, K., Grothe, C., Von Neuhoff, N., Dengler, R., & Petri, S. (2008). Nuclear erythroid 2-related factor 2-antioxidative response element signaling pathway in motor cortex and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(11), 1055–1062.
- Sartucci, F., Tovani, S., Murri, L., & Sagliocco, L. (2007). Motor and somatosensory evoked potentials in Autosomal Dominant Hereditary Spastic Paraparesis (ADHSP) linked to chromosome 2p, SPG4. *Brain Research Bulletin*, 74(4), 243–249.
- Sasaki, S. (2011). Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(5), 349–359.
- Sasaki, S., & Iwata, M. (1999). Ultrastructural change of synapses of Betz cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 268(1), 29–32.
- Sasaki, S., & Iwata, M. (2000). Immunocytochemical and ultrastructural study of the motor cortex in patients with lower motor neuron disease. *Neuroscience Letters*, 281(1), 45–48.
- Sasaki, S., & Maruyama, S. (1994). Immunocytochemical and ultrastructural studies of the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 87(6), 578–585.
- Sathasivam, S. (2010). Motor neurone disease: Clinical features, diagnosis, diagnostic pitfalls and prognostic markers. *Singapore Medical Journal*, 51(5), 367–372.
- Sathasivam, S., Ince, P. G., & Shaw, P. J. (2001). Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 27(4), 257–274.
- Sawada, H. (2017). Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(7), 1–14.
- Saxena, S., Cabuy, E., & Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature Neuroscience*, 12(5), 627–636.
- Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H. El, Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., Allmeroth, K., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., René, F., Dormann, D., Haass, C., Ludolph, A. C., Lagier-Tourenne, C., Storkebaum, E., & Dupuis, L. (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 133(6), 887–906.
- Scekic-Zahirovic, J., Sendscheid, O., El Oussini, H., Jambeau, M., Sun, Y., Mersmann, S., Wagner, M., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., Drenner, K., Birling, M.-C., Qiu, J., Zhou, Y., Li, H., Fu, X.-D., Rouaux, C., Shelkovnikova, T., Witting, A., Ludolph, A. C., Kiefer, F., Storkebaum, E., Lagier-Tourenne, C., & Dupuis, L. (2016). Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *The EMBO Journal*, 35(10), 1077–1097.
- Schaefer, A. M., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2005). A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Comparative Neurology*, 490(3), 209–219.
- Schepens, B., & Drew, T. (2004). Independent and convergent signals from the pontomedullary reticular formation contribute to the control of posture and movement during reaching in the cat. *Journal of Neurophysiology*, 92(4), 2217–2238.
- Schieber, M. H. (2007). Chapter 2 comparative anatomy and physiology of the corticospinal system. *Handbook of Clinical Neurology*, 82, 15–37.
- Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P., & Migheli, A. (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 139, S27–33.
- Schmidt, E. F., Warner-Schmidt, J. L., Otopalik, B. G., Pickett, S. B., Greengard, P., & Heintz, N. (2012). Identification of the cortical neurons that mediate antidepressant responses. *Cell*, 149(5), 1152–1163.
- Schmidt, R., de Reus, M. A., Scholtens, L. H., van den Berg, L. H., & van den Heuvel, M. P. (2016). Simulating disease propagation across white matter connectome reveals anatomical substrate for neuropathology staging in amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroImage*, 124, 762–769.
- Schwarz, G. A., & Liu, C.-N. (1956). Hereditary (familial) spastic paraplegia; further clinical and pathologic observations. *AMA Archives of Neurology and Psychiatry*, 75(2), 144–162.
- Shan, X., Chang, Y., & Lin, C. G. (2007). Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression. *The FASEB Journal*, 21, 2753–2764.
- Shaw, P. J. (2005). Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 76(8), 1046–1057.
- Shaw, P. J., Forrest, V., Ince, P. G., Richardson, J. P., & Wastell, H. J. (1995). CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration*, 4(2), 209–216.
- Shaw, P. J., Ince, P. G., Falkous, G., & Mantle, D. (1995). Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord.

## BIBLIOGRAPHIE

*Annals of Neurology*, 38(4), 691–695.

Shepherd, G. M. (2011). The Microcircuit Concept Applied to Cortical Evolution: from Three-Layer to Six-Layer Cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5, 1–15.

Shepherd, G. M. G. (2013). Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(4), 278–291.

Shibuya, K., Simon, N. G., Geevasinga, N., Menon, P., Howells, J., Park, S. B., Huynh, W., Noto, Y. ichi, Vucic, S., & Kiernan, M. C. (2017). The evolution of motor cortical dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurophysiology*, 128(6), 1075–1082.

Silberberg, G., & Markram, H. (2007). Disynaptic Inhibition between Neocortical Pyramidal Cells Mediated by Martinotti Cells. *Neuron*, 53(5), 735–746.

Simeone, T. a, Sanchez, R. M., & Rho, J. M. (2004). Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Journal of Child Neurology*, 19(5), 343–360.

Simpson, E. P., Henry, Y. K., Henkel, J. S., Smith, R. G., & Appel, S. H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients A potential biomarker of disease burden. *Neurology*, 62(10), 1758–1765.

Singer, M. A., Statland, J. M., Wolfe, G. I., & Barohn, R. J. (2007). Primary Lateral Sclerosis. *Muscle and Nerve*, 35(3), 291–302.

Snowden, J. S., Harris, J., Richardson, A., Rollinson, S., Thompson, J. C., Neary, D., Mann, D. M. A., & Pickering-Brown, S. (2013). Frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis: a clinical comparison of patients with and without repeat expansions in C9orf72. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 14(3), 172–176.

Sobue, G., Hashizume, Y., Mukai, E., Hirayama, M., Mitsuma, T., & Takahashi, A. (1989). X-linked recessive bulbospinal neuronopathy. A clinicopathological study. *Brain*, 112(1), 209–232.

Song, C., Guo, J., Liu, Y., & Tang, B. (2012). Autophagy and Its Comprehensive Impact on ALS. *The International Journal of Neuroscience*, 122(12), 695–703.

Sorenson, E. J. (2012). The electrophysiology of the motor neuron diseases. *Neurologic Clinics*, 30(2), 605–620.

Spencer, P. S., Nunn, P. B., Hugon, J., Ludolph, A. C., Ross, S. M., Roy, D. N., & Robertson, R. C. (1987). Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science*, 237(4814), 517–522.

Srinivasan, K., Friedman, B., Larson, J., Lauffer, B., Goldstein, L., Appling, L., Borneo, J., Poon, C., Ho, T., Cai, F., Steiner, P., van der Brug, M., Modrusan, Z., Kaminker, J., & Hansen, D. (2016). Untangling the brain's neuroinflammatory and neurodegenerative transcriptional responses. *Nature Communications*, 7, 1–16.

Staiger, J. F., Flaggmeyer, I., Schubert, D., Zilles, K., Kötter, R., & Luhmann, H. J. (2004). Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. *Cerebral Cortex*, 14(6), 690–701.

Stevanin, G., Azzedine, H., Denora, P., Boukhris, A., Tazir, M., Lossos, A., Rosa, A., Lerer, I., Hamri, A., Alegria, P., Loureiro, J., Tada, M., Hannequin, D., Anheim, M., Goizet, C., Gonzalez-Martinez, V., Le Ber, I., Forlani, S., Iwabuchi, K., Meiner, V., Uyanik, G., Erichsen, A., Feki, I., Pasquier, F., Belarbi, S., Cruz, V., Depienne, C., Truchetto, J., Garrigues, G., Tallaksen, C., Tranchant, C., Nishizawa, M., Vale, J., Coutinho, P., Santorelli, F., Mhiri, C., Brice, A., & Durr, A. (2008). Mutations in SPG11 are frequent in autosomal recessive spastic paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain*, 131(3), 772–784.

Strong, M. J. (2001). Progress in Clinical Neurosciences: The Evidence for ALS as a Multisystems Disorder of Limited Phenotypic Expression. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 28(4), 283–298.

Strong, M. J., & Gordon, P. H. (2005). Primary lateral sclerosis, hereditary spastic paraplegia and amyotrophic lateral sclerosis: discrete entities or spectrum? *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 6(1), 8–16.

Strong, M. J., Kesavapany, S., & Pant, H. C. (2005). The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(8), 649–664.

Sugino, K., Hempel, C. M., Miller, M. N., Hattox, A. M., Shapiro, P., Wu, C., Huang, Z. J., & Nelson, S. B. (2006). Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. *Nature Neuroscience*, 9(1), 99–107.

Sun, S., Sun, Y., Ling, S.-C., Ferraiuolo, L., McAlonis-Downes, M., Zou, Y., Drenner, K., Wang, Y., Ditsworth, D., Tokunaga, S., Kopelevich, A., Kaspar, B. K., Lagier-Tourenne, C., & Cleveland, D. W. (2015). Translational profiling identifies a cascade of damage initiated in motor neurons and spreading to glia in mutant SOD1-mediated ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(50), E6993-7002.

Swash, M., & Desai, J. (2000). Motor neuron disease : classification and nomenclature. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 1(2), 105–112.

Swinnen, B., & Robberecht, W. (2014). The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 10(11), 661–670.

Takahashi, T., Goto, T., Miyama, S., Nowakowski, R. S., & Caviness, V. S. (1999). Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *The Journal of Neuroscience*, 19(23), 10357–10371.

Tan, W., Pasinelli, P., & Trotti, D. (2014). Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et*

## BIBLIOGRAPHIE

*Biophysica Acta*, 1842(8), 1295–1301.

Tanaka, M., Chock, P. B., & Stadtman, E. R. (2007). Oxidized messenger RNA induces translation errors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1), 66–71.

Tanaka, Y. H., Tanaka, Y. R., Fujiyama, F., Furuta, T., Yanagawa, Y., & Kaneko, T. (2011). Local Connections of Layer 5 GABAergic Interneurons to Corticospinal Neurons. *Frontiers in Neural Circuits*, 5, 1–14.

Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T. N. T., Kim, T. T. K., Jarsky, T., Yao, Z., Levi, B. B., Gray, L. T., Sorensen, S. A., Dolbeare, T., Bertagnolli, D., Goldy, J., Shapovalova, N., Parry, S., Lee, C. C., Smith, K., Bernard, A., Madisen, L., Sunkin, S. M., Hawrylycz, M., Koch, C., & Zeng, H. (2016). Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nature Neuroscience*, 19(2), 335–346.

Taylor, J. P., Brown, R. H., & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, 539(7628), 197–206.

Tennant, K. A., Adkins, D. L., Donlan, N. A., Asay, A. L., Thomas, N., Kleim, J. A., & Jones, T. A. (2011). The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cerebral Cortex*, 21(4), 865–876.

Thau, N., Knippenberg, S., Körner, S., Rath, K. J., Dengler, R., & Petri, S. (2012). Decreased mRNA expression of PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$ -regulated factors in the SOD1G93A ALS mouse model and in human sporadic ALS. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 71(12), 1064–1074.

Thomsen, G. M., Gowing, G., Latter, J., Chen, M., Vit, J.-P., Staggenborg, K., Avalos, P., Alkaslasi, M., Ferraiuolo, L., Likhite, S., Kaspar, B. K., & Svendsen, C. N. (2014). Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *Journal of Neuroscience*, 34(47), 15587–15600.

Thomson, A. M., & Lamy, C. (2007). Functional maps of neocortical local circuitry. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), 19–42.

Thorpe, J. W., Moseley, I. F., Hawkes, C. H., MacManus, D. G., McDonald, W. I., & Miller, D. H. (1996). Brain and spinal cord MRI in motor neuron disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 61(3), 314–317.

Tietjen, I., Rihel, J., Cao, Y., Koentges, G., Zakhary, L., & Dulac, C. (2003). Single-cell transcriptional analysis of neuronal progenitors. *Neuron*, 38(2), 161–175.

Tobisawa, S., Hozumi, Y., Arawaka, S., Koyama, S., Wada, M., Nagai, M., Aoki, M., Itoyama, Y., Goto, K., & Kato, T. (2003). Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(2), 496–503.

Tresse, E., Salomons, F. A., Vesa, J., Bott, L. C., Kimonis, V., Yao, T. P., Dantuma, N. P., & Taylor, J. P. (2010). VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. *Autophagy*, 6(2), 217–227.

Troost, D., Sillevs Smitt, P. A. E., de Jong, J. M. B. B., & Swaab, D. F. (1992). Neurofilament and glial alterations in the cerebral cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 84(6), 664–673.

Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N. C., Brown, R. H., & Hediger, M. A. (1999). SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nature Neuroscience*, 2(5), 427–433.

Tsao, W., Jeong, Y. H., Lin, S., Ling, J., Price, D. L., Chiang, P. M., & Wong, P. C. (2012). Rodent models of TDP-43: recent advances. *Brain Research*, 1462, 26–39.

Turner, M. R., Agosta, F., Bede, P., Govind, V., Lulé, D., & Verstraete, E. (2012). Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomarkers in Medicine*, 6(3), 319–337.

Turner, M. R., Cagnin, A., Turkheimer, F. E., Miller, C. C. J., Shaw, C. E., Brooks, D. J., Leigh, P. N., & Banati, R. B. (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiology of Disease*, 15(3), 601–609.

Turner, M. R., Kiernan, M. C., Leigh, P. N., & Talbot, K. (2009). Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet. Neurology*, 8(1), 94–109.

Turner, M. R., Wicks, P., Brownstein, C. A., Massagli, M. P., Toronjo, M., Talbot, K., & Al-Chalabi, A. (2011). Concordance between site of onset and limb dominance in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 82(8), 853–854.

Udaka, F., Kameyama, M., & Tomonaga, M. (1986). Degeneration of Betz cells in motor neuron disease. A Golgi study. *Acta Neuropathologica*, 70(3–4), 289–295.

Uluğ, A. M., Grünewald, T., Lin, M. T., Kamal, A. K., Filippi, C. G., Zimmerman, R. D., & Beal, M. F. (2004). Diffusion Tensor Imaging in the Diagnosis of Primary Lateral Sclerosis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 19(1), 34–39.

Urban, P. P., Vogt, T., & Hopf, H. C. (1998). Corticobulbar tract involvement in amyotrophic lateral sclerosis. A transcranial magnetic stimulation study. *Brain*, 121(6), 1099–1108.

Valdmanis, P. N., Meijer, I. A., Reynolds, A., Lei, A., MacLeod, P., Schlesinger, D., Zatz, M., Reid, E., Dion, P. A., Drapeau, P., & Rouleau, G. A. (2007). Mutations in the KIAA0196 Gene at the SPG8 Locus Cause Hereditary Spastic Paraplegia. *The American Journal of Human Genetics*, 80(1), 152–161.

Van Den Bosch, L., Tilkin, P., Lemmens, G., & Robberecht, W. (2002). Minocycline delays disease onset and mortality in a

## BIBLIOGRAPHIE

- transgenic model of ALS. *Neuroreport*, 13(8), 1067–1070.
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., & Robberecht, W. (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(11–12), 1068–1082.
- van Es, M., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R., Veldink, J., & van den Berg, L. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 6736(17), 1–15.
- van Langenhove, T., van der Zee, J., & van Broeckhoven, C. (2012). The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration–amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Annals of Medicine*, 44(8), 817–828.
- van Zundert, B., Peuscher, M. H., Hynynen, M., Chen, A., Neve, R. L., Brown, R. H., Constantine-Paton, M., & Bellingham, M. C. (2008). Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 28(43), 10864–10874.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., de Belleruche, J., Gallo, J.-M., Miller, C. C., & Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, 323(5918), 1208–1211.
- Vandenberg, R. J. (1998). Molecular pharmacology and physiology of glutamate transporters in the central nervous system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 25(6), 393–400.
- Verstraete, E., Veldink, J. H., Hendrikse, J., Schelhaas, H. J., van den Heuvel, M. P., & van den Berg, L. H. (2012). Structural MRI reveals cortical thinning in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 83(4), 383–388.
- Verstraete, E., Veldink, J. H., Mandl, R. C. W., van den Berg, L. H., & van den Heuvel, M. P. (2011). Impaired structural motor connectome in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 6(9), 1–10.
- Verstraete, E., Veldink, J. H., van den Berg, L. H., & Van den Heuvel, M. P. (2014). Structural brain network imaging shows expanding disconnection of the motor system in amyotrophic lateral sclerosis. *Human Brain Mapping*, 35(4), 1351–1361.
- Vesia, M., Bolton, D. A., Mochizuki, G., & Staines, W. R. (2013). Human parietal and primary motor cortical interactions are selectively modulated during the transport and grip formation of goal-directed hand actions. *Neuropsychologia*, 51(3), 410–417.
- Vucic, S., & Kiernan, M. C. (2006). Novel threshold tracking techniques suggest that cortical hyperexcitability is an early feature of motor neuron disease. *Brain*, 129(9), 2436–2446.
- Vucic, S., & Kiernan, M. C. (2008). Cortical excitability testing distinguishes Kennedy’s disease from amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurophysiology*, 119(5), 1088–1096.
- Vucic, S., Nicholson, G. A., & Kiernan, M. C. (2008). Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 131(6), 1540–1550.
- Vucic, S., Rothstein, J. D., & Kiernan, M. C. (2014). Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends in Neurosciences*, 37(8), 433–442.
- Vucic, S., Ziemann, U., Eisen, A., Hallett, M., & Kiernan, M. C. (2013). Transcranial magnetic stimulation and amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiological insights. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 84(10), 1161–1170.
- Vukosavic, S., Dubois-Dauphin, M., Romero, N., & Przedborski, S. (1999). Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 73(6), 2460–2468.
- Wall, P. D., & Lidieth, M. (1997). Five sources of a dorsal root potential: their interactions and origins in the superficial dorsal horn. *Journal of Neurophysiology*, 78(2), 860–871.
- Wang, S. J., Wang, K. Y., & Wang, W. C. (2004). Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience*, 125(1), 191–201.
- Wang, Y., Toledo-Rodriguez, M., Gupta, A., Wu, C., Silberberg, G., Luo, J., & Markram, H. (2004). Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *The Journal of Physiology*, 561(1), 65–90.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, 10(1), 57–63.
- Waragai, M. (1997). MRI and clinical features in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroradiology*, 39(12), 847–851.
- Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V. C., Price, D. L., Wong, P. C., & Rothstein, J. D. (2001). Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiology of Disease*, 8(6), 933–941.
- Weber, M., Eisen, A., Stewart, H., & Hirota, N. (2000). The split hand in ALS has a cortical basis. *Journal of the Neurological Sciences*, 180(1–2), 66–70.
- 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), 18809–18814.
- Wiedemann, F. R., Manfredi, G., Mawrin, C., Flint Beal, M., & Schon, E. A. (2002). Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *Journal of Neurochemistry*, 80(4), 616–625.

## BIBLIOGRAPHIE

- Wiedemann, F. R., Winkler, K., Kuznetsov, V., Bartels, C., Vielhaber, S., Feistner, H., & Kunz, W. S. (1998). Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, *156*(1), 65–72.
- Wijesekera, L. C., & Leigh, P. N. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *4*, 1–22.
- Williams, T. L., Day, N. C., Ince, P. G., Kamboj, R. K., & Shaw, P. J. (1997). Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *42*(2), 200–207.
- Williamson, T. L., & Cleveland, D. W. (1999). Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nature Neuroscience*, *2*(1), 50–56.
- Wills, A.-M., Hubbard, J., Macklin, E. A., Glass, J., Tandan, R., Simpson, E. P., Brooks, B., Gelinas, D., Mitsumoto, H., Mozaff, T., Hanes, G. P., Ladha, S. S., Heiman-Patterson, T., Katz, J., Lou, J.-S., Mahoney, K., Grasso, D., Lawson, R., Yu, H., & Cudkowicz, M. (2014). Hypercaloric enteral nutrition in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *The Lancet*, *383*(9934), 2065–2072.
- Wong, N. K. Y., He, B. P., & Strong, M. J. (2000). Characterization of neuronal intermediate filament protein expression in cervical spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *59*(11), 972–982.
- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W., & Price, D. L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, *14*(6), 1105–1116.
- Wu, D., Ré, D., Nagai, M., Ischiropoulos, H., & Przedborski, S. (2006). The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(32), 12132–12137.
- Xiong, W., Grillet, N., Elledge, H. M., Wagner, T. F. J., Zhao, B., Johnson, K. R., Kazmierczak, P., & Muller, U. (2012). TMHS is an integral component of the mechanotransduction machinery of cochlear hair cells. *Cell*, *151*(6), 1283–1295.
- Xu, X., Roby, K. D., & Callaway, E. M. (2010). Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: Three chemically distinct classes of inhibitory cells. *Journal of Comparative Neurology*, *518*(3), 389–404.
- Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E. A., Garcia, M. L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O. R., Cleveland, D. W., & Goldstein, L. S. B. (2008). Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(21), 7594–7599.
- Yang, W. W., Sidman, R. L., Taksir, T. V., Treleaven, C. M., Fidler, J. A., Cheng, S. H., Dodge, J. C., & Shihabuddin, L. S. (2011). Relationship between neuropathology and disease progression in the SOD1G93A ALS mouse. *Experimental Neurology*, *227*(2), 287–295.
- Yang, Y., Gozen, O., Watkins, A., Lorenzini, I., Lepore, A., Gao, Y., Vidensky, S., Brennan, J., Poulsen, D., Won Park, J., Li Jeon, N., Robinson, M. B., & Rothstein, J. D. (2009). Presynaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1. *Neuron*, *61*(6), 880–894.
- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H. X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W. Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A. C., Cole, N., Gascon, G., Yagmour, A., Ben-Hamida, M., Pericak-Vance, M., Hentati, F., & Siddique, T. (2001). The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, *29*(2), 160–165.
- Yasvoina, M., Genç, B., Jara, J., Sheets, P., Quinlan, K., Milosevic, A., Shepherd, G., Heckman, C., & Özdinler, P. (2013). eGFP expression under UCHL1 promoter genetically labels corticospinal motor neurons and a subpopulation of degeneration-resistant spinal motor neurons in an ALS mouse model. *Journal of Neuroscience*, *33*(18), 7890–7904.
- Yoon, G., Baskin, B., Tarnopolsky, M., Boycott, K. M., Geraghty, M. T., Sell, E., Goobie, S., Meschino, W., Banwell, B., & Ray, P. N. (2013). Autosomal recessive hereditary spastic paraplegia - Clinical and genetic characteristics of a well-defined cohort. *Neurogenetics*, *14*(3–4), 181–188.
- Yoshihara, T., Ishigaki, S., Yamamoto, M., Liang, Y., Niwa, J. I., Takeuchi, H., Doyu, M., & 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), 158–167.
- Yu et al. (2008). Local-circuit phenotypes of layer 5 neurons in motor-frontal cortex of YFP-H mice. *Frontiers in Neural Circuits*, *2*, 1–8.
- Zang, D. W., & Cheema, S. S. (2002). Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1 (G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, *332*(2), 99–102.
- Zhai, P., Pagan, F., Statland, J., Butman, J. A., & Floeter, M. K. (2003). Primary lateral sclerosis: A heterogeneous disorder composed of different subtypes? *Neurology*, *60*(8), 1258–1265.
- Zhang, B., Tu, P. H., Abtahian, F., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (1997). Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *Journal of Cell Biology*, *139*(5), 1307–1315.

## BIBLIOGRAPHIE

- Zhang, Q., Mao, C., Jin, J., Niu, C., Bai, L., Dang, J., & Zhang, M. (2014). Side of limb-onset predicts laterality of gray matter loss in amyotrophic lateral sclerosis. *BioMed Research International*, 2014.
- Zhang, W., Zhang, L., Liang, B., Schroeder, D., Zhang, Z., Cox, G. A., Li, Y., & Lin, D.-T. (2016). Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nature Neuroscience*, 19(4), 557–559.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O’Keeffe, S., Phatnani, H. P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S. A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B. A., & Wu, J. Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 34(36), 11929–11947.
- Zhu, S., Stavrovskaya, I. G., Drozda, M., Kim, B. Y. S., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A. S., Hartley, D. M., Wu, D. C., Gullans, S., Ferrante, R. J., Przedborski, S., Kristal, B. S., & Friedlander, R. M. (2002). Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 417(6884), 74–78.
- Zona, C., Siniscalchi, A., Mercuri, N. ., & Bernardi, G. (1998). Riluzole interacts with voltage-activated sodium and potassium currents in cultured rat cortical neurons. *Neuroscience*, 85(3), 931–938.
- Zufiria, M., Gil-Bea, F. J., Fernández-Torrón, R., Poza, J. J., Muñoz-Blanco, J. L., Rojas-García, R., Riancho, J., & de Munain, A. L. (2016). ALS: a bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Progress in Neurobiology*, 142, 104–129.
- Zürcher, N. R., Loggia, M. L., Lawson, R., Chonde, D. B., Izquierdo-Garcia, D., Yasek, J. E., Akeju, O., Catana, C., Rosen, B. R., Cudkovicz, M. E., Hooker, J. M., & Atassi, N. (2015). Increased in vivo glial activation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: assessed with [11C]-PBR28. *NeuroImage. Clinical*, 7, 409–414.

# **ANNEXES**



## Annexe 1. Liste des publications et présentations

### Liste de publications :

#### *Soumises :*

El Oussini H., Scekcic-Zahirovic J., Vercruyssen P., **Marques C.**, Dieterlé S., Picchiarelli G., Sinniger J., Rouaux C. & Dupuis L.. Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. Sous presse à *Annals of Neurology*.

Ibshirani M., Zhao B., Gentil B.J., Minotti S., **Marques C.**, Keith J., Rogaevea E., Zinman L., Rouaux C., Robertson J., Durham H.D. Dysregulation of chromatin remodeling complexes in amyotrophic lateral sclerosis. Sous presse à *Human Molecular Genetics*.

#### *En préparations :*

(1) **Marques C.**, Fischer M., Scekcic-Zahirovic J., Burg T., Streit A., Keime C., and Rouaux C. Presymptomatic corticospinal motor neuron loss involves a new set of early molecular players in amyotrophic lateral sclerosis.

(2) **Marques C.** and Rouaux C. Characterization of the cortical pathology in the *Sod1<sup>G86R</sup>* mouse model of ALS.

(3) **Marques C.**, Fischer M. and Rouaux C. FACS purification of adult corticospinal motor neurons from individual mouse brain

### Liste des communications orales et par affiches :

- **Journée Neuropôle**, Strasbourg, France, 2015 - **oral**  
Mise en évidence des mécanismes moléculaires qui sous-tendent le dysfonctionnement et la dégénérescence des Neurones Moteurs Cortico-Spinaux dans la Sclérose Latérale Amyotrophique. **Marques C.** and Rouaux C.
- **Journée de la FMTS**, Strasbourg, France 2016 - **oral**  
Unravelling the molecular mechanisms behind corticospinal motor neuron degeneration in ALS. **Marques C.** and Rouaux C.
- **Journées de l'Ecole doctorale**, Strasbourg, France, 2015 - **poster**  
Unravelling the molecular mechanisms that trigger Corticospinal Motor Neurons dysfunction and death in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Marques C.** and Rouaux C.
- Congrès **ENCALS**, Dublin, Irlande, 2015 – **1<sup>er</sup> prix poster**  
Unravelling the molecular mechanisms behind corticospinal motor neuron degeneration in ALS. **Marques C.** and Rouaux C.
- Congrès **JR2SLA**, Paris, France, 2016 - **poster**  
Mise en évidence des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la dégénérescence des neurones moteurs cortico-spinaux dans la sclérose latérale amyotrophique. **Marques C.** and Rouaux C.
- Congrès **MND**, Dublin, Irlande, 2016 - **poster**  
Unravelling the molecular mechanisms behind corticospinal motor neuron degeneration in ALS. **Marques C.** and Rouaux C.
- Congrès **ENCALS**, Ljubljana, Slovénie, 2017 - **poster**  
Unravelling the molecular mechanisms behind corticospinal motor neuron degeneration in ALS. **Marques C.**, Fischer M., Burg T., Scekcic-Zahirovic J., Streit A., Keime C., Mendoza M. A., and Rouaux C.

## **Annexe 2. Publication N°1 (sous presse) issue de travaux en collaboration**

### **Dysregulation of chromatin remodelling complexes in amyotrophic lateral sclerosis**

Michael Tibshirani,<sup>1</sup> Beibei Zhao,<sup>2</sup> Benoit J.-C. Gentil,<sup>1</sup> Sandra Minotti,<sup>1</sup> Christine Marques,<sup>4</sup> Julia Keith,<sup>3</sup> Ekaterina Rogaeva,<sup>2</sup> Lorne Zinman,<sup>3</sup> Caroline Rouaux,<sup>4</sup> Janice Robertson<sup>2,3</sup>, Heather D. Durham<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology/Neurosurgery and Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec H3A 2B3, Canada

<sup>2</sup>Tanz Centre for Research in Neurodegenerative Disease, University of Toronto, Toronto, Ontario M5T 2S8, Canada

<sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, and Sunnybrook Health Sciences Center, Toronto, Ontario M4N 3M5, Canada

<sup>4</sup>Inserm U1118, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 67 085 Strasbourg Cedex, France

**\*Corresponding author:** Heather D. Durham, PhD

Rm 649 Montreal Neurological Institute,

3801 University St., Montreal QC H3A 2B4, Canada

email: [heather.durham@mcgill.ca](mailto:heather.durham@mcgill.ca) telephone: 1-514-398-8509 fax: 1-514-398-1509

**ABSTRACT**

Amyotrophic Lateral Sclerosis is a fatal neurodegenerative disease with paralysis resulting from dysfunction and loss of motor neurons. A common neuropathological finding is attrition of motor neuron dendrites, which make central connections vital to motor control. The chromatin remodelling complex, neuronal Brg1-associated factor complex (nBAF), is critical for neuronal differentiation, dendritic extension and synaptic function. We have identified loss of the crucial nBAF subunits Brg1, BAF53b and CREST in cultured motor neurons expressing FUS or TDP-43 mutants linked to familial amyotrophic lateral sclerosis. When plasmids encoding wild type or mutant human FUS or TDP-43 were expressed in motor neurons of dissociated spinal cord cultures prepared from E13 mice, mutant proteins in particular accumulated in the cytoplasm. Immunolabelling of nBAF subunits was reduced in proportion to loss of nuclear FUS or TDP-43 and depletion of Brg1 was associated with nuclear retention of *Brg1* mRNA. Dendritic attrition (loss of intermediate and terminal dendritic branches) occurred in motor neurons expressing mutant, but not wild type, FUS or TDP-43. This attrition was delayed by ectopic over-expression of Brg1 and was reproduced by inhibiting Brg1 activity either through genetic manipulation or treatment with the chemical inhibitor, PFI-3, demonstrating the importance of Brg1 to maintenance of dendritic architecture. Loss of nBAF subunits was also documented in spinal motor neurons in autopsy tissue from familial amyotrophic sclerosis (*C9ORF72* with  $G_4C_2$  nucleotide expansion) and from sporadic cases with no identified mutation, pointing to dysfunction of nBAF chromatin remodelling in multiple forms of ALS.

### **Annexe 3. Publication N°2 (sous presse) issue de travaux en collaboration**

#### **Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis**

Hajer El Oussini, PhD<sup>1,2</sup>, Jelena Scekcic-Zahirovic, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Pauline Vercruysse, PhD<sup>1,2,3</sup>, Christine Marques<sup>1,2</sup>, Sylvie Dirrig-Grosch, PhD<sup>1,2</sup>, Stéphane Dieterlé<sup>1,2</sup>, Gina Picchiarelli<sup>1,2</sup>, Jérôme Sinniger<sup>1,2</sup>, Caroline Rouaux, PhD<sup>1,2</sup>  
& Luc Dupuis, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR-S1118, faculté de médecine, Strasbourg, 67085 France.

<sup>2</sup> Université de Strasbourg, fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg, France.

<sup>3</sup> Department of Neurology, University of Ulm, Germany.

Corresponding author: Dr. Luc Dupuis

Corresponding author's address: Inserm UMR-S1118,

Faculté de médecine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, cedex, France

Corresponding author's phone and fax: +33 3 68 85 30 82; +33 3 68 85 30 65

Corresponding author's e-mail address: [ldupuis@unistra.fr](mailto:ldupuis@unistra.fr)

Running head: serotonin neurons and spasticity in ALS

Number of words in abstract: 231

Number of words in main text: 4183

Number of figures: 6

Number of tables: 0

**ABSTRACT (231 words)**

**Objective:** Spasticity occurs in a wide range of neurological diseases, including neurodegenerative diseases, after trauma or after stroke and is characterized by increased reflexes leading to muscle hypertonia. Spasticity is a painful symptom and can severely restrict everyday life, but might also participate in maintaining a low level of motor function in severely impaired patients. Constitutive activity of the serotonin receptors 5-HT<sub>2B/C</sub> is required for the development of spasticity after spinal cord injury or during amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We sought here to provide direct evidence for a role of brainstem serotonin neurons in spasticity.

**Methods:** *SOD1*(G37R) mice expressing a conditional allele of an ALS-linked SOD1 mutation were crossed to Tph2-CRE mice expressing CRE in serotonergic neurons. Measurement of long lasting reflex using EMG, behavioural follow up and histological techniques were used to characterize spasticity and motor phenotype.

**Results:** Deleting mutant SOD1 expression selectively in brainstem serotonin neurons was sufficient to rescue loss of TPH2 immunoreactivity and largely preserve serotonin innervation of motor neurons in the spinal cord. Furthermore, this abrogated constitutive activity of 5-HT<sub>2B/C</sub> receptors and abolished spasticity in end-stage mice. Consistent with spasticity mitigating motor symptoms, selective deletion worsened motor function and accelerated the onset of paralysis.

**Interpretation:** Degeneration of serotonin neurons is necessary to trigger spasticity through the 5-HT<sub>2B/C</sub> receptor. The wide range of drugs targeting the serotonergic system could be useful to treat spasticity in neurological diseases.

# Dégénérescence des Neurones Moteurs Cortico-Spinaux dans un modèle murin de Sclérose Latérale Amyotrophique : dynamique spatio-temporelle et mécanismes moléculaires

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) se définit cliniquement par la dégénérescence combinée des neurones moteurs cortico-spinaux (NMCS) et des motoneurones bulbaires et spinaux (MnB et MnS). Quoique l'idée d'une origine corticale de la SLA soit de plus en plus considérée, la pathologie corticale, la dynamique spatio-temporelle de la dégénérescence des NMCS et les voies moléculaires impliquées restent peu connues. Ce travail de thèse a essentiellement cherché à pallier ce manque. Nous avons montré que chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, la perte des NMCS, qui semble se produire en l'absence de gliose réactionnelle majeure, se manifeste de manière somatotopique et précède l'apparition des symptômes moteurs et la dégénérescence des MnS. Nous avons purifié, grâce au développement d'un nouveau protocole, les NMCS adultes du cortex cérébral de souris saines ou malades à quatre stades de la maladie. L'analyse RNA-seq a permis d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires précoces pouvant fournir une base pour le développement d'approches thérapeutiques fondées sur le maintien de NMCS sains et fonctionnels, et à long terme, à initier des stratégies thérapeutiques alternatives pour la SLA.

**Mots clés :** Neurones Moteurs Cortico-Spinaux, Cortex Cérébral, Transcriptomique, Sclérose Latérale Amyotrophique

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is clinically defined as the combined degeneration of the cortico-spinal motor neurons (CSMN) along with the bulbar and spinal motor neurons (BMN and SMN). While a growing body of evidence points to the cerebral cortex as the potential initiation site of ALS, little is known about the cortical pathology, the spatio-temporal dynamics of CSMN degeneration, and the molecular pathways involved. This thesis work aimed at filling this knowledge gap. In *Sod1<sup>G86R</sup>*, we showed that CSMN loss seems to take place without major gliosis, occurs in a somatotopic manner and precedes motor symptom appearance and SMN degeneration. We purified, thanks to the development of a novel protocol, adult CSMN from the cerebral cortex of healthy or diseased mice from early presymptomatic ages to the end stage of the disease. The RNA-seq analysis has made it possible to identify new and early molecular players in ALS. This would provide a foundation for the development of therapeutic approaches based on the maintenance of healthy and functional CSMN, and, on the long run, may in turn inform the development of alternative therapeutic strategies for ALS.

**Keywords:** Corticospinal Motor Neurons, cerebral cortex, transcriptomics, Amyotrophic lateral sclerosis