



**HAL**  
open science

# Altérations des entrées synaptiques et origine de la vacuolisation dans les motoneurones de souris *sod1g93a*, modèle de la sclérose latérale amyotrophique

Clemence Martinot

► **To cite this version:**

Clemence Martinot. Altérations des entrées synaptiques et origine de la vacuolisation dans les motoneurones de souris *sod1g93a*, modèle de la sclérose latérale amyotrophique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB259 . tel-02110521

**HAL Id: tel-02110521**

**<https://theses.hal.science/tel-02110521>**

Submitted on 25 Apr 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.



UNIVERSITÉ  
**PARIS  
DESCARTES**

**U-PC**

Université Sorbonne  
Paris Cité

**CLEMENCE MARTINOT**

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE  
SPECIALITE NEUROSCIENCES**

**POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE**

**ALTERATIONS DES ENTREES SYNAPTIQUES ET ORIGINE DE LA VACUOLISATION  
DANS LES MOTONEURONES DE SOURIS **SOD1<sup>G93A</sup>**,  
MODELE DE LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE**

**SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30 JUIN 2017 DEVANT UN JURY COMPOSE DE**

**PASCAL BRANCHEREAU  
FREDERIC BROCARD  
STEPHANE CHARPIER  
MIREILLE LAFORGE  
DANIEL ZYTNIKI**

**UNIVERSITE BORDEAUX  
UNIVERSITE AIX-MARSEILLE  
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE  
UNIVERSITE PARIS DESCARTES  
UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

**RAPPORTEUR  
RAPPORTEUR  
EXAMINATEUR  
INVITEE  
DIRECTEUR DE THESE**



Centre  
de Neurophysique,  
Physiologie et Pathologie  
UMR 8119



**ed3c**









## REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je remercie vivement Pascal Branchereau, Frédéric Brocard, Stéphane Charpier et Mireille Laforge pour avoir accepté de constituer mon jury de thèse.

Je souhaite remercier Daniel Zytnicki de m'avoir accueillie dans son équipe pour réaliser ma thèse, et de m'avoir encadrée pendant quatre ans. Etant ingénieur agronome, le domaine de la recherche et des neurosciences était tout nouveau pour moi. Je le remercie de m'avoir donné la chance de le découvrir.

Je tiens à remercier particulièrement Mireille Laforge, pour son investissement, son dynamisme et son expertise, et Jérôme Estaquier, pour ses précieux conseils.

Je remercie les membres de mon équipe pour leurs conseils et leur gentillesse : Marin Manuel qui m'a sauvé de nombreuses expériences, Rebecca Manuel, qui s'occupe avec soin de nos souris, mais aussi Boris Lamotte d'Incamps, Lourdes Martinez-Da Silva, et ceux qui sont partis : Marcin Bączyk, Félix Leroy, et Nicolas Delestrée pour m'avoir appris la chirurgie.

Je remercie les membres du laboratoire : les directeurs Claude Meunier et Claire Legay, Carole Sens pour sa réactivité, Ludivine Pidoux pour avoir partagé mon quotidien au laboratoire, et tous les autres.

Merci aux membres des plateformes des Saint-Pères, je pense à l'animalerie avec Claire Mader et toute son équipe, et à la plateforme d'imagerie de Jean-Maurice Petit.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement mes parents, Jean-François Martinot et Marie-Sophie Martinot, mais aussi ma famille, mes amis, et enfin Quentin Aubry, qui ont entendu parler de souris pendant ces quatre dernières années et ne s'en sont jamais plaints. Merci pour leur soutien sans faille, et leur volonté de comprendre et partager avec moi ce domaine qui leur est inconnu.

LISTE DES ABREVIATIONS	9
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>11</b>
<b>1.1 LE MOTONEURONE ET L'UNITE MOTRICE</b>	<b>13</b>
<b>1.2 LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE</b>	<b>16</b>
<b>1.3 SOD1 : MODELE DE SLA</b>	<b>18</b>
<b>1.4 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SLA</b>	<b>19</b>
1.4.1 COMPORTEMENT ET CHANGEMENTS SYSTEMIQUES	19
1.4.2 CHANGEMENTS CELLULAIRES	21
1.4.3 CELLULES GLIALES	37
1.4.4 CHANGEMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES -HYPOTHESE DE L'EXCITOTOXICITE	38
<b>1.5 PLAN DE LA THESE</b>	<b>48</b>
<b>2 MATERIEL ET METHODES</b>	<b>51</b>
<b>2.1 ANIMAUX ET PREPARATION</b>	<b>53</b>
<b>2.2 ELECTROPHYSIOLOGIE</b>	<b>55</b>
<b>2.3 MARQUAGES INTRACELLULAIRES</b>	<b>59</b>
<b>2.4 MARQUAGES RETROGRADES</b>	<b>60</b>
<b>2.5 IMMUNOHISTOCHEMIE</b>	<b>61</b>
<b>2.6 IMMUNOEMPREINTE (WESTERN BLOT)</b>	<b>62</b>
2.6.1 LYSE CELLULAIRE ET DOSAGE DE PROTEINES	62
2.6.2 IMMUNOEMPREINTE	63
<b>2.7 ANALYSES</b>	<b>64</b>
2.7.1 COMPTAGE DES MITOCHONDRIES ET DES VACUOLES D'AUTOPHAGIE	64
2.7.2 QUANTIFICATION DES MAM	64
2.7.3 COMPTAGES DES SYNAPSES	65
2.7.4 QUANTIFICATION DE LA LUMINOSITE DU MARQUAGE GLUR2	66
<b>2.8 STATISTIQUES</b>	<b>67</b>
<b>3 VACUOLISATION DES VARICOSITES SUR LES DENDRITES DE MOTONEURONES SOD1</b>	<b>69</b>
<b>3.1 INTRODUCTION</b>	<b>71</b>
<b>3.2 CARACTERISATION DES VACUOLES DE VARICOSITES</b>	<b>72</b>
3.2.1 LA VACUOLISATION EST DUE A LA MUTATION SOD1	72
3.2.2 LES VACUOLES GROSSISSENT AVEC L'AGE ET FUSIONNENT	74
3.2.3 LES VACUOLES GROSSISSENT DIFFEREMMENT SELON LE TYPE PHYSIOLOGIQUE DU MOTONEURONE	76
3.2.4 LES VARICOSITES ACCUMULENT LES VACUOLES	79
<b>3.3 ORIGINE(S) DES VACUOLES</b>	<b>80</b>
3.3.1 ORIGINE MITOCHONDRIALE DES VACUOLES	80
3.3.2 IMPLICATION DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LA VACUOLISATION	85
<b>3.4 DEFAUT D'ELIMINATION DES VACUOLES PAR DEFAUT DU MECANISME D'AUTOPHAGIE</b>	<b>88</b>
3.4.1 DANS LA MOELLE	89

3.4.2	DANS LE MOTONEURONE SPECIFIQUEMENT	92
3.4.3	PERTURBATION DE LA MITOPHAGIE DANS LES SOURIS SOD1	99
<b>3.5</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>101</b>
<b>4</b>	<b>ETUDE DES ENTREES SYNAPTIQUES</b>	<b>103</b>
<b>4.1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>105</b>
<b>4.2</b>	<b>ETUDE ANATOMIQUE DES SYNAPSES</b>	<b>105</b>
4.2.1	LA DENSITE DES CONTACTS NE CHANGE PAS SUR LE SOMA	106
4.2.2	PAS DE CHANGEMENT SYNAPTIQUE SUR LES DENDRITES	109
<b>4.3</b>	<b>ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE DES ENTREES SYNAPTIQUES</b>	<b>111</b>
4.3.1	DIMINUTION DE L'EXCITATION DANS LES SOURIS SOD1	113
4.3.2	DIMINUTION DE L'INHIBITION DANS LES MOTONEURONES DE SOURIS SOD1	119
<b>4.4</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>126</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>129</b>
<b>5.1</b>	<b>HYPOTHESE DE L'ORIGINE DES VACUOLES</b>	<b>132</b>
5.1.1	LA VACUOLISATION EST SPECIFIQUEMENT LIEE A LA MUTATION SOD1	132
5.1.2	ORIGINE MITOCHONDRIALE DES VACUOLES	134
5.1.3	HYPOTHESE 1 : LES VACUOLES SONT LIEES A UN AFFLUX D'IONS LOCAL	134
5.1.4	HYPOTHESE 2 : LES VACUOLES PROVIENNENT DES PEROXYSOMES	137
5.1.5	LES VACUOLES NE SONT PAS ELIMINEES PAR L'AUTOPHAGIE	141
<b>5.2</b>	<b>HOMEOSTASIE DE L'EXCITATION ET DE L'EXCITABILITE</b>	<b>143</b>
5.2.1	BAISSE DES COURANTS EXCITATEURS ET INHIBITEURS	143
5.2.2	ORIGINE DE LA BAISSSE DES COURANTS SYNAPTIQUES	145
5.2.3	EVOLUTION DE L'EXCITABILITE AVEC LA MALADIE	147
<b>5.3</b>	<b>PERSPECTIVES</b>	<b>149</b>
<b>5.4</b>	<b>CONCLUSION SUR L'HYPOTHESE DE L'EXCITOTOXICITE</b>	<b>150</b>
5.4.1	PAS D'EXCITOTOXICITE GLUTAMATERGIQUE	150
5.4.2	DYSFONCTIONNEMENTS METABOLIQUES LIES AU CALCIUM	150
5.4.3	TOXICITE CALCIQUE	152
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>155</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AMPA</b> : acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique	<b>MLF</b> : faisceau longitudinal médian ( <i>medial longitudinal fasciculus</i> )
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>MN</b> : motoneurone
<b>Atg5</b> : protéine d'autophagie ( <i>autophagy protein 5</i> ) impliquée dans l'induction de l'autophagie	<b>mPTP</b> : pore de transition mitochondrial ( <i>mitochondrial permeability transition pore</i> )
<b>ATP</b> : adénosine triphosphate	<b>MW</b> : Mann-Whitney
<b>Beclin</b> : protéine impliquée dans l'initiation de l'autophagie	<b>Nb</b> : neurobiotine
<b>BiP</b> : protéine liant l'immunoglobuline ( <i>binding immunoglobulin protein</i> )	<b>NMDA</b> : acide N-méthyl-D-aspartique
<b>BSA</b> : sérum d'albumine bovine ( <i>Bovine Serum albumine</i> )	<b>NO</b> : oxyde nitrique ( <i>nitric oxide</i> )
<b>CaIR</b> : calréticuline	<b>OPA1</b> : atrophie optique type 1 ( <i>optic atrophy type 1</i> )
<b>ChaT</b> : choline acetyltransférase	<b>PA</b> : potentiel d'action
<b>CTb</b> : cholératoxine B	<b>Parkin</b> : protéine de reconnaissance des mitochondries endommagées pour être éliminées par l'autophagie
<b>COX-IV</b> : oxydase du cytochrome C ( <i>cytochrome C oxidase</i> )	<b>PIC</b> : courant persistant entrant ( <i>persistent inward current</i> )
<b>CY3</b> : cyanine C	<b>PMP70</b> : protéine membranaire peroxysomale 70 ( <i>peroxisomal membrane protein 70</i> )
<b>EAAT2</b> : transporteur d'acide aminé exciteur ( <i>excitatory amino acid transporter 2</i> )	<b>PPSE</b> : potentiel post-synaptique exciteur
<b>FF</b> : rapide fatigable ( <i>fast fatigable</i> )	<b>PPSI</b> : potentiel post-synaptique inhibiteur
<b>FR</b> : rapide résistant ( <i>fast resistant</i> )	<b>p62</b> : aussi appelée SQSTM1 (sequestosome1), protéine liant l'ubiquitine, marqueur du flux d'autophagie
<b>FUS</b> : fusionné dans le sarcome ( <i>fused in sarcoma</i> )	<b>RE</b> : réticulum endoplasmique
<b>GluR2</b> : récepteur au glutamate 2 ( <i>glutamate receptor 2</i> )	<b>ROS</b> : dérivé réactif de l'oxygène ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>IPSC</b> : cellule pluripotente induite ( <i>induced pluripotent stem cell</i> )	<b>S</b> : lent résistant ( <i>slow</i> )
<b>IP3R</b> : récepteur inositol triphosphate ( <i>inositol triphosphate receptor</i> )	<b>SLA</b> : sclérose latérale amyotrophique
<b>L</b> : lombaire	<b>SOD1</b> : superoxyde dismutase 1
<b>LAMP</b> : protéine membranaire lysosomale ( <i>lysosomal associated membrane protein</i> )	<b>TDP43</b> : protéine TAR liant l'ADN ( <i>TAR DNA-binding protein</i> )
<b>LC3</b> : protéine associée aux microtubules à chaîne légère 1A/1B ( <i>microtubule associated protein 1A/1B light chain 3</i> )	<b>Th</b> : thoracique
<b>MAM</b> : zone de contact mitochondrie/réticulum ( <i>mitochondria associated-ER membrane</i> )	<b>TIM</b> : translocateur de la membrane interne ( <i>translocase of the inner membrane</i> )
<b>mCU</b> : canal mitochondrial uniporteur de calcium ( <i>mitochondrial calcium uniporter</i> )	<b>TMS</b> : stimulation magnétique transcranienne ( <i>transcranial magnetic stimulation</i> )
<b>MFN2</b> : mitofusine 2	<b>TOM</b> : translocateur de la membrane externe ( <i>translocase of the outer membrane</i> )
	<b>TS</b> : Triceps Suræ
	<b>UPR</b> : réponse aux protéines mal repliées ( <i>unfolded protein response</i> )

**VDAC** : canal anionique voltage dépendant  
(*voltage-dependant anion channel*)

**VGAT** : transporteur vésiculaire du GABA  
(*vesicular GABA transporter*)

**VGlut1** : transporteur vésiculaire du glutamate  
1 (*vesicular glutamate transporter 1*)

**VGlut2** : transporteur vésiculaire du glutamate  
2 (*vesicular glutamate transporter 2*)

**WT** : contrôle (*wild type*)

## **1 INTRODUCTION**

---





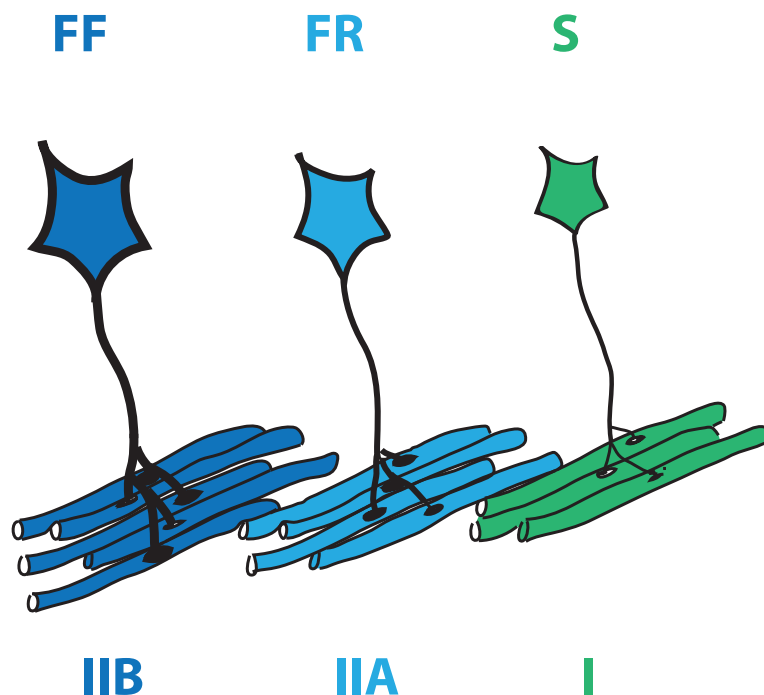
## 1.1 LE MOTONEURONE ET L'UNITE MOTRICE

---

Le motoneurone a une place et un rôle décisifs dans l'exécution du mouvement. C'est le point de convergence de toutes les informations motrices : informations des voies descendantes du cortex moteur, circuits spinaux, systèmes sensoriels. Il intègre toutes ces entrées synaptiques afin de transmettre une excitation cohérente aux muscles. En effet, les entrées synaptiques, reçues principalement sur l'arborisation dendritique du motoneurone, convergent vers le soma du motoneurone ou elles se somment et déclenchent un train de potentiels d'action. Le train est transmis par l'axone du motoneurone, depuis la moelle épinière jusqu'aux fibres musculaires, déclenchant alors leur contraction. Le motoneurone, du fait de son rôle intégrateur, a une anatomie particulière. C'est en effet la plus longue cellule du corps humain, grâce à son axone pouvant mesurer 1,50 mètre de long. Situé en partie ventrale de la moelle épinière, son arborisation dendritique est également très développée, mesurant jusqu'à 1 millimètre de diamètre chez la souris. Cette taille importante lui permet de s'étendre sur toute la corne ventrale de la moelle épinière et d'intégrer toutes les informations, sensorielles, descendantes, qu'elles soient directes ou relayées par un ou plusieurs interneurons. Les travaux de Charles Sherrington et de ses

successeurs ont montré que, chez le mammifère adulte, un motoneurone unique innerve plusieurs fibres musculaires d'un même muscle, mais qu'une fibre musculaire n'est innervée que par un motoneurone<sup>1-3</sup>. L'ensemble constitué d'un motoneurone et de la totalité des fibres musculaires qu'il innerve est appelé unité motrice.

Il existe une grande variété de motoneurones. On distingue d'abord les motoneurones *gamma* qui innervent les fuseaux neuromusculaires<sup>4</sup>. Les fuseaux musculaires, dispersés entre les fibres musculaires au sein d'un muscle, servent à coder la variation de la longueur du muscle. Les motoneurones *alpha* innervent uniquement les fibres extrafusales, dont la contraction sert au mouvement<sup>4</sup>. Ils innervent des fibres musculaires aux propriétés contractiles distinctes, ceci afin d'augmenter la diversité et la précision des mouvements. Trois unités motrices incluant des motoneurones *alpha* sont référencées, définies selon les critères de la vitesse de contraction de leurs fibres musculaires et leur capacité à soutenir une contraction prolongée<sup>5,6</sup> (Figure 1). Les unités motrices *Fast Fatigable* (FF) se contractent rapidement, peuvent produire une grande force lors de leur contraction, mais elles se fatiguent vite. Elles sont donc excitées pour des contractions intenses et rapides. Les unités motrices *Fast Resistant* (FR) se contractent moins rapidement. Elles peuvent produire un effort assez intense et se fatiguent plus lentement. Elles sont donc excitées pour des contractions moyennement intenses et longues. Les unités motrices *Slow* (S) se contractent lentement. Leur force est faible mais elles peuvent se contracter très longtemps. Chez le mammifère, chaque muscle possède ces trois unités motrices en proportions très variables. Par exemple, chez le chat, le muscle Gastrocnémien Médian est constitué des trois types d'unités motrices en proportions équivalentes<sup>7</sup>, alors que le muscle Soléaire est en revanche presque exclusivement composé d'unités motrices de type S<sup>8</sup>. Ces proportions varient selon l'espèce étudiée : par exemple chez la souris, le muscle soléaire est constitué d'unités motrices de type S et de type FR<sup>9</sup>.



**Figure 1 : Représentation schématique des différents types d'unités motrices des motoneurones alpha.** Les motoneurones *Fast Fatigable* innervent les fibres musculaires de type IIB. Les motoneurones de type *Fast Resistant* innervent les fibres musculaires de type IIA. Les motoneurones de type *Slow* innervent les fibres musculaires de type I.

En parallèle de l'hétérogénéité des

motoneurones, on distingue trois types de fibres musculaires sur la base de la réactivité de leur ATPase<sup>10</sup> et de leur composition en chaînes lourdes myofibrillaires<sup>11</sup>. Ces fibres épuisent leur réserve de glycogène en des temps différents. En effet, les fibres à contraction forte utilisent rapidement leur glycogène qui est dégradé par glycolyse. Les fibres à contraction lente mais durable utilisent la respiration, qui dégrade plus lentement le glycogène mais pour produire plus d'énergie. La respiration utilise les enzymes oxydatives. En déplaçant les réserves de glycogène par stimulation répétée des unités motrices, et en révélant les enzymes oxydatives dans les fibres musculaires, Burke et al.<sup>5</sup> ont ainsi pu mettre en évidence l'homogénéité des fibres musculaires au sein d'une même unité motrice, et la remarquable correspondance entre le type de fibre et le type d'unité motrice : les fibres de type I, IIA et IIB étant respectivement innervées par les unités motrices de type S, FR et FF<sup>5</sup> (Figure 1). Les différences de propriétés contractiles s'expliquent ainsi par l'utilisation différente de réserve de glycogène et la capacité à en produire rapidement ainsi que l'expression différentielle des isoformes de chaînes lourdes de myosine<sup>11</sup>. Burke et al.<sup>6</sup> ont également montré que chaque unité motrice contient un nombre différent de

fibres musculaires : les unités motrices de type S n'en contiennent que très peu, les unités motrices de type FR en contiennent plus, et les unités de type FF en contiennent beaucoup (Figure 1). Il est intéressant de constater que la taille des somas et le diamètre des axones des motoneurones sont d'autant plus grands que le nombre de fibres musculaires innervées est grand. Ainsi, les motoneurones des unités motrices de type S ont un plus petit soma et un plus petit diamètre axonal que les motoneurones des unités motrices de type FR, eux-mêmes plus petits que les somas et les diamètres axonaux des motoneurones des unités motrices de type FF (Figure 1).

## 1.2 LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE

---

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative au cours de laquelle les motoneurones spinaux et bulbaires meurent. La SLA a été initialement décrite par le neurologue Jean-Martin Charcot, en 1869. En France, la SLA est d'ailleurs souvent référencée comme « maladie de Charcot ». Aux Etats-Unis, elle est communément appelée « maladie de Lou Gehrig », du nom d'un joueur de baseball américain renommé, mort de cette maladie en 1941.

Sur le plan clinique, les symptômes débutent avec des fasciculations musculaires menant progressivement à la paralysie des membres, de la déglutition, de la parole et finalement des muscles respiratoires. Deux formes de SLA existent. La forme bulbaire, au cours de laquelle les motoneurones bulbaires dégénèrent en premier, touche plutôt les femmes et apparaît vers 60-65 ans. La forme spinale qui représente deux tiers des cas, affecte en premier les motoneurones spinaux, elle touche davantage les hommes vers 55 ans<sup>12</sup>. La durée de vie après diagnostic varie entre un et cinq ans. Un seul traitement a été approuvé par la Food and Drugs Administration (FDA : Agence américaine des

produits alimentaires et médicamenteux), le riluzole. Mais son efficacité est limitée, il ne permet en effet de prolonger la durée de vie des patients que de quelques mois. La difficulté à trouver un traitement peut venir, d'une part, de la non-compréhension des mécanismes de la maladie menant à la mort des motoneurones, d'autre part, du fait que une partie des motoneurones a déjà dégénéré avant le début des symptômes<sup>13,14</sup>. Avec une incidence dans le monde de 2-3 pour 100 000 personnes, c'est la plus importante maladie du motoneurone. La maladie se déclenche habituellement vers 60 ans ou plus tard (forme adulte), mais quelques cas apparaissent chez le jeune adulte et l'enfant (forme juvénile).

Dans 90% des cas l'origine de la maladie est sporadique, mais des formes familiales apparaissent dans 10% des cas. L'étude des génomes de ces familles a permis l'identification de plus de vingt mutations sur une large variété de gènes impliqués dans la maladie (Tableau 1).

**Tableau 1 : Gènes impliqués dans la SLA (modifié de Chen et al, 2013<sup>15</sup>)**

<b>Gène</b>	<b>Protéine</b>	<b>Forme</b>	<b>Transmission</b>
SOD1	Cu/Zn SOD1	Adulte	AD/AR
Alsin	Alsin	Juvénile	AR
Inconnu (18q21)	Inconnue	Adulte	AD
SETX	Senataxin	Juvénile	AD
SPG11	Spatacsin	Juvénile	AR
FUS	Fused in Sarcoma	Juv/Adu	AD/AR
VAPB	VAPB	Adulte	AD
ANG	Angiogenin	Adulte	AD
TARDBP	DNA-binding protéine	Adulte	AD
FIG4	Phosphoinositide-5phosphatase	Adulte	AD
OPTN	Optineurin	Adulte	AD/AR
VCP	VCP	Adulte	AD
UBQLN2	Ubiquilin 2	Juv/Adu	Inconnue
SIGMAR1	SIGMAR1	Juvénile	AR
Inconnu (9q21-22)	Inconnue	Adulte	AD
C9ORF72	C9ORF72	Adulte	AD
DCTN1	Dynactin	Adulte	AD
Inconnu (18q21)	Inconnue	Adulte	AD
Inconnu (20 p13)	Inconnue	Adulte	AD/AR
DAO	DAO	Adulte	AD

Les mutations les plus importantes sont SOD1<sup>16</sup> (1993) ,TDP43<sup>17</sup> (2008), (FUS)<sup>18</sup> (2009), et la mutation la plus fréquente, trouvée dans 23,5% des formes familiales de la maladie, C9orf72<sup>19,20</sup> (2011). Il est intéressant de constater que les protéines de tous ces gènes ont des fonctions très différentes, mais qu'elles mènent toutes à des perturbations physiopathologiques similaires et aux mêmes symptômes.

## 1.3 SOD1 : MODELE DE SLA

---

Parmi toutes ces mutations, nous nous intéressons à celles ayant lieu sur le gène de la protéine SOD1. C'est en effet la première mutation découverte dans la maladie, et la plus étudiée. Les mutations SOD1, dominantes autosomales pour la plupart, sur les exons 2 et 4 du gène codant pour la Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1, chromosome 21), ont été retrouvées dans 20% des cas familiaux et 3 % des cas sporadiques<sup>16</sup>. La protéine SOD1 est largement exprimée dans le cytoplasme, le noyau, les lysosomes et l'espace intermembranaire des mitochondries des différents types cellulaires, elle constitue ainsi 0,5-0,8% des protéines solubles du cerveau<sup>21</sup>. C'est une métalloenzyme de 153 acides aminés<sup>16</sup>. Elle forme un homodimère en liant un ion zinc et un ion cuivre en son cœur. Son rôle est d'éliminer les radicaux libres superoxyde ( $O_2^-$ ) dans la cellule en les catalysant en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Elle assure une importante défense antioxydante dans presque toutes les cellules exposées à l'oxygène. Les patients SLA montrent une diminution de l'activité dismutase<sup>22</sup> et développent des dommages oxydatifs<sup>23,24</sup>, mais le niveau d'activité enzymatique de la SOD1 ne semble pas être corrélé à l'agressivité de la maladie<sup>25</sup>. La maladie proviendrait donc d'un « gain de fonction toxique » des protéines SOD1 mutées par rapport à la protéine non mutée.

Plusieurs mutations ont été identifiées sur le gène SOD1 : D90A (l'alanine remplace l'acide aspartique au codon 90) qui a la plus forte prévalence en Europe ; A4V, plus présente aux Etats-Unis ; ou H46R au Japon. La mutation G93A (l'alanine remplace la guanine au codon 93) est relativement rare, c'est cependant une des plus étudiées. En effet, la première lignée de souris transgénique modélisant la SLA a été créée à partir de l'introduction dans le génome de la souris de multiples copies du gène SOD1<sup>G93A</sup><sup>26</sup>. Le modèle « high expressor gene » est le plus utilisé aujourd'hui. Dans ce modèle, la protéine mutée est exprimée de façon ubiquitaire mais déclenche une dégénérescence des motoneurons et des cellules cortico-spinales<sup>26,27</sup>. Ce modèle reproduit ainsi des caractéristiques cliniques et pathologiques similaires à la SLA chez l'homme<sup>28</sup>.

## 1.4 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SLA

---

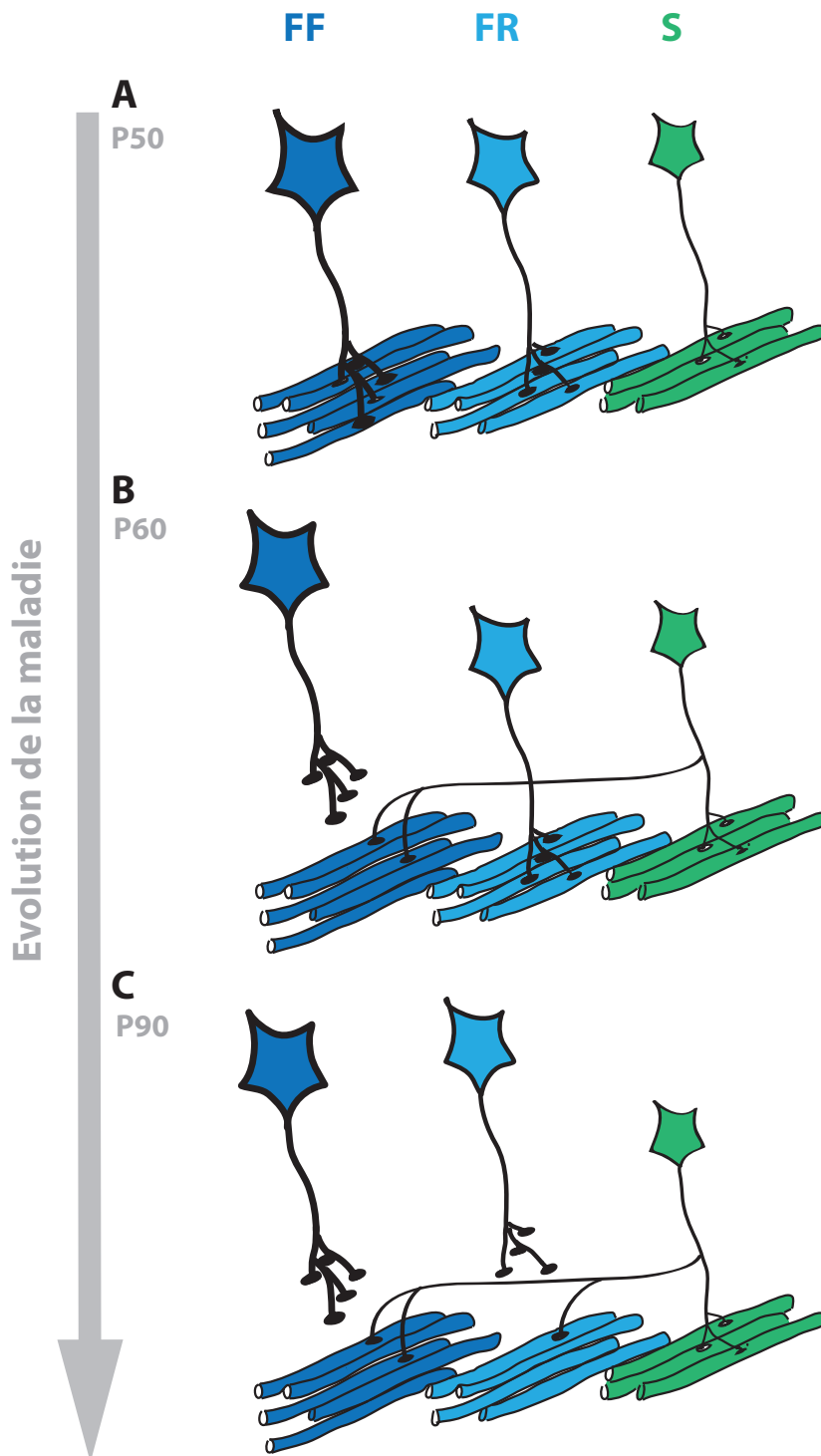
### 1.4.1 COMPORTEMENT ET CHANGEMENTS SYSTEMIQUES

Les premiers indices moteurs de la maladie chez les souris SOD1<sup>G93A</sup> apparaissent dès P10. Les reflexes de retournement (du dos sur le ventre) sont plus lents, et les animaux montrent des défauts de placement des pattes antérieures. Cependant, les changements locomoteurs et de vitesse de course ne deviennent évidents qu'après P60<sup>29,30</sup>. En effet, à cet âge, les muscles à contraction rapide (Tibialis Antérieur, Extenseur Digitorum Longus, Gastrocnémien Médian) montrent une chute de la force musculaire, alors que les muscles à contraction plus lente (Soléaire) semblent épargnés<sup>9</sup>. Cette perte de force est due à une première vague de rétractation des jonctions neuromusculaires qui affecte les fibres musculaires IIB des unités motrices FF<sup>31</sup> (Figure 2). On observe en parallèle une ré-innervation des fibres dénervées par les unités motrices FR et S<sup>32</sup>. Une seconde vague de dénervation a lieu à P90,



concernant les unités motrices FR<sup>32</sup>. Les muscles rapides deviennent faibles, les muscles lents commencent à être touchés<sup>9</sup>. La paralysie du train arrière devient évidente à cet âge. C'est le stade symptomatique. Dès P100, les corps cellulaires

des unités motrices FF dégénèrent, ceux des unités motrices S restent intacts jusqu'à la mort<sup>33,34</sup>. Les membres postérieurs deviennent complètement paralysés à P125, les membres antérieurs à P135, peu avant la mort de la souris<sup>35</sup>.

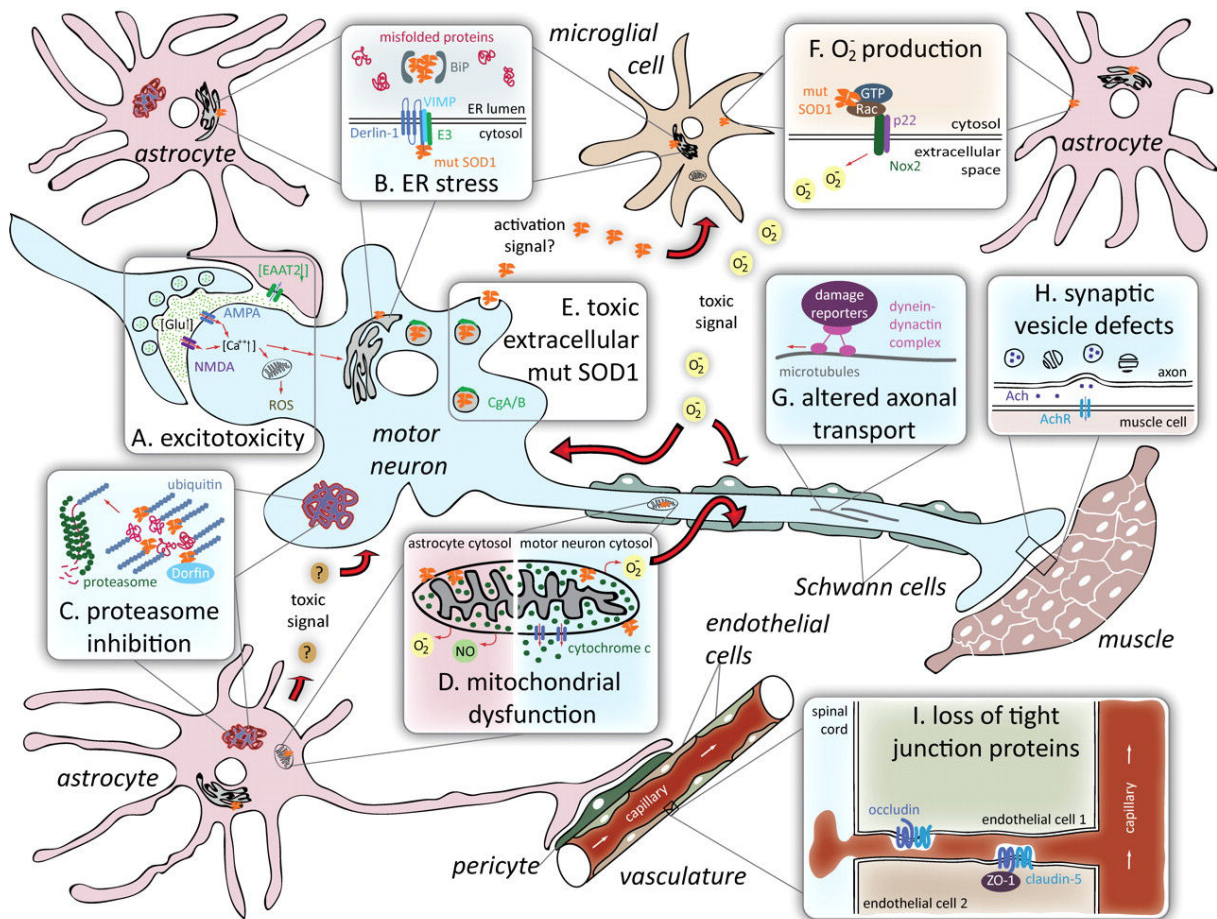


**Figure 2 : Dénervation des jonctions neuromusculaires dans le modèle SOD1<sup>G93A</sup>.**

**A :** Innervation normale des fibres musculaires I, IIA et IIB par les motoneurons S, FR et FF respectivement. **B :** Dénervation spécifique des fibres musculaires IIB accompagnée d'une atrophie musculaire à un stade présymptomatique et réinnervation partielle de ces fibres par les motoneurons FR et S. **C :** Dénervation des unités motrices FR marquant le début de la paralysie.

## 1.4.2 CHANGEMENTS CELLULAIRES

Même si le mécanisme global de la maladie menant à la rétractation des jonctions neuromusculaires et à la mort des motoneurones n'est pas connu, de nombreux dérèglements physiologiques ont été observés ces dernières années, au niveau cellulaire, morphologique ou électrophysiologique (Figure 3). Il est difficile de comprendre les implications entre ces différents mécanismes, si ce sont les causes de la maladie ou des conséquences compensatoires, ou encore si chaque mécanisme est déterminant dans le décours de la maladie.



**Figure 3 : Mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la neurodégénérescence dans la SLA.** **A** : L'excitotoxicité pourrait être l'hyperactivation des motoneurones en réponse à la faible recapture du glutamate dans la fente synaptique par le transporteur astrocytaire EAAT2. **B** : Le stress du réticulum endoplasmique (RE) est induit par les interactions de la protéine SOD1 mutée avec les protéines du RE. **C** : L'inhibition du protéasome est due à l'encombrement des agrégats ubiquitinés. **D** : La dysfonction mitochondriale médiée par l'interaction avec la SOD1 mutée

provoque la baisse de la production d'ATP dans les motoneurones et le stress nitrosatif dans les astrocytes. **E** : La protéine mutante SOD1, toxique, est sécrétée dans l'espace extracellulaire des motoneurones et des astrocytes. **F** : la production superoxide des glies peut abimer le motoneurone. **G** : Le transport axonal est altéré dans la SLA. **H** : Des défauts de vésicules synaptiques sont reportés dans les motoneurones SOD1. **I** : Disruption de la barrière hématoencéphalique par perte des jonctions serrées des cellules endothéliales. Adapté de Ilieva et al, 2009<sup>36</sup>.

#### 1.4.2.1 AGREGATS MOLECULAIRES

La protéine SOD1 mutée interagit avec plusieurs molécules et organites dans la cellule. Elle interagit d'abord avec elle-même, formant des agrégats de protéines dans le cytoplasme. C'est par ces agrégats qu'elle pourrait acquérir sa toxicité<sup>37</sup>. De nombreuses études ont montré que la présence d'agrégats de SOD1 réduit l'activité dismutase, même si la protéine SOD1 non mutée est initialement active<sup>38</sup>. En effet, une augmentation des dommages oxydatifs et nitrosatifs a été observée dans les souris SOD1<sup>G93A</sup><sup>39</sup> et chez les patients SLA<sup>40</sup>. La SOD1 mutée peut également former des radicaux libres ou nitrer des protéines de façon aberrante, du fait de sa conformation structurelle différente due à la mutation<sup>41,42</sup>. La protéine SOD1 et ses agrégats produisent ainsi un stress oxydatif.

#### 1.4.2.2 MITOCHONDRIE ET SLA

##### FONCTION MITOCHONDRIALE

La mitochondrie est un organite cellulaire essentiel et joue un rôle primordial dans la cellule, elle est le siège de la synthèse d'ATP. Sa présence est particulièrement importante dans les neurones où la production d'ATP permet le maintien des gradients ioniques et donc la communication neuronale. La mitochondrie est composée d'une double membrane, interne et externe fonctionnellement distinctes et séparées par un espace nommé l'espace intermembranaire, d'une matrice contenant un ADN mitochondrial circulaire

(ADNmt), des ribosomes, des ARN de transfert. Le repliement de la membrane vers l'intérieur forme les crêtes mitochondriales, c'est le cristae.

#### DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE

Les mitochondries peuvent fusionner ou se fissionner afin de répondre à des besoins cellulaires, notamment énergétiques. Cette « fusion et fission » mitochondriale crée une organisation en réseau appelé réseau mitochondrial. C'est l'équilibre entre la fusion et la fission qui définit l'état du réseau : la fusion mitochondriale tend vers un réseau filamenteux dont les filaments sont interconnectés, la fission mitochondriale tend vers un réseau fragmenté. Cet équilibre est dynamique et dépend des conditions métaboliques et de l'environnement cellulaire. En outre, la fusion et la fission mitochondriale jouent un rôle dans les processus d'apoptose et de mitophagie<sup>43</sup>. Le processus de fission mitochondriale est assuré par les protéines DRP1 (*dynamain related protein 1*) et Fis1 (*mitochondrial fission protein 1*). L'inhibition de DRP1 par surexpression du mutant dominant négatif empêche le passage au phénotype ponctiforme des mitochondries, inhibe la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial et la libération du cytochrome C, donc inhibe l'induction de l'apoptose<sup>44</sup>. Lors du processus de fission mitochondriale, DRP1 s'oligomérisse et forme des anneaux autour de la mitochondrie, et par son activité GTPasique fissionne la mitochondrie. La fusion mitochondriale nécessite l'intervention de deux protéines appartenant à la famille des GTPase : OPA 1 (*optic atrophy 1*)<sup>45</sup> et les MFN 1 et 2 (mitofusines 1-2)<sup>46</sup>. Les mitofusines assurent la fusion des deux membranes externes mitochondriales, tandis qu'OPA 1 permet la fusion des membranes internes<sup>47</sup>. Des études ont montré qu'OPA 1 peut maintenir les jonctions des crêtes mitochondriales fermées par formation d'oligomères d'OPA 1<sup>48</sup>.

#### DYSFONCTIONNEMENT DES MITOCHONDRIES DANS LA SLA

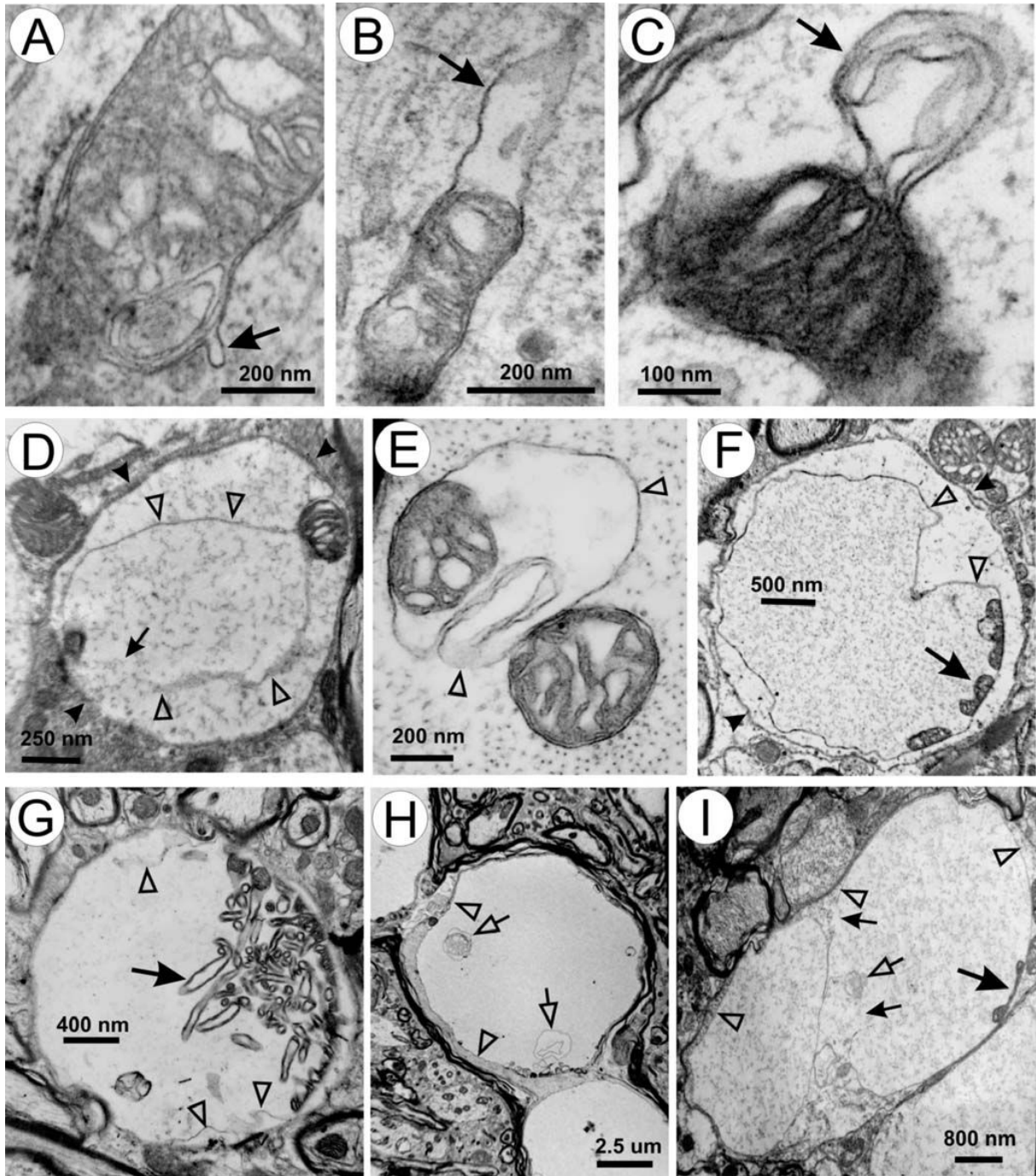
La protéine SOD1 mutée agit sur des organites, notamment la mitochondrie. La mitochondrie est très largement étudiée dans la

physiopathologie de la SLA puisque les conséquences de sa dégénérescence sur le motoneurone sont importantes. On note en effet de nombreux dysfonctionnements de la mitochondrie : problèmes structuraux, problèmes de dynamique, dysfonctionnements métaboliques, et difficultés à accomplir son rôle de tampon calcique.

Au niveau structurel, la mitochondrie change de forme. Les analyses en microscopie confocale montrent une réduction de sa longueur, et une forme plus arrondie<sup>49</sup>. La microscopie électronique montre également un diamètre augmenté, les crêtes du cristæ se disjoignent, le cristæ gonfle<sup>50,51</sup>. Enfin, la microscopie électronique montre des vacuoles dans les mitochondries dans la moelle épinière<sup>52</sup>. Higgins et al.<sup>51</sup> montrent que c'est l'espace intermitochondrial qui se vacuolise (Figure 4).

La dynamique mitochondriale est modifiée par la mutation. La balance fusion/fission n'est plus respectée, la fusion en particulier est altérée dans le soma et l'axone<sup>53</sup>. De fait, la densité mitochondriale peut en être modifiée. De manière intéressante, les analyses immunohistochimiques montrent une densité mitochondriale plus faible<sup>53,54</sup>. Les analyses de microscopie électronique montrent une densité différentielle selon les compartiments étudiés : l'axone a une densité mitochondriale plus faible, alors que le soma et les dendrites ont un nombre de mitochondries inchangé par la maladie<sup>50</sup>. La distribution des mitochondries évolue : parce que le transport rétrograde des mitochondries est altéré dès P45 dans les souris SOD1<sup>G93A</sup> (fréquence et vitesse réduites), elles s'accumulent en partie distale des dendrites et de l'axone. Le transport antérograde étant également altéré à partir de P90, elles finissent par former des clusters dans les dendrites, ou près des nœuds de Ranvier dans l'axone<sup>49,53,55</sup>. Ces problèmes de dynamique empêchent la bonne localisation des mitochondries au niveau des synapses, créant ainsi des besoins énergétiques.





**Figure 4 : Exemples de vacuoles mitochondriales.** **A** : Une petite vésicule de membrane externe (flèche). **B-D** : Agrandissement des vésicules (flèches) et expansion de l'espace intermitochondrial. **E** : Plus grande séparation des membranes externes et internes et expansion de l'espace intermitochondrial. **F-I** : Exemples de vacuoles matures. Les pointes de flèches transparentes en D-I montrent la membrane vacuolaire. Les larges flèches en F-I indiquent les restes de membrane interne. Les petites flèches en D et I indiquent des zones cassées de la membrane vacuolaire. Les petites flèches transparentes en H et I pointent les éléments membranaires vésiculaires dans les vacuoles. Les pointes de flèches en D et F indiquent les membranes dendritiques. Adapté de Higgins et al, 2003<sup>51</sup>.

La protéine SOD1 agit de plus sur la respiration. Le potentiel membranaire mitochondrial se dépoliarise nettement<sup>56</sup>, ce qui empêche le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire. La respiration diminue, au profit de la glycolyse<sup>57</sup>. La mitochondrie produit moins d'ATP, ce qui crée dans la cellule une déplétion d'ATP. La mitochondrie, sous l'effet de la mutation SOD1 produit également de plus nombreux ROS<sup>39,40,56</sup>. L'incapacité de la cellule à éliminer correctement ce surplus crée un stress oxydatif.

Enfin, la mitochondrie dans le motoneurone a un rôle important de tampon calcique. En effet, le motoneurone possède très peu de protéines chélatrices de calcium, afin de permettre un flux calcique rapide et ainsi une décharge répétitive du motoneurone. La mitochondrie est un des organites, avec le réticulum endoplasmique, qui permet l'évacuation du calcium du cytosol, et le relargage dans le cytosol en cas d'entrée synaptique. La mutation SOD1 altère cette fonction, car la mitochondrie ne stocke pas suffisamment de calcium. Il apparaît également que la cinétique d'intrusion du calcium est retardée, et que l'extrusion est déficiente<sup>58</sup>. De plus, une quantité trop importante de calcium cytosolique bloque le mCU, le canal uniporteur de calcium qui permet l'afflux de calcium dans la mitochondrie<sup>59</sup>. Outre les difficultés que la mitochondrie manifeste à pomper et relarguer le calcium du cytosol, le calcium lui-même dégrade la mitochondrie des motoneurones SOD1, elle produit plus de ROS sous l'action du calcium<sup>60</sup>. De plus, une concentration calcique élevée intramitochondriale ouvre le pore multi-protéique mPTP (pore de transition perméable mitochondrial). En effet le calcium régule son ouverture via la cyclophiline D, une des protéines du pore. L'ouverture de ce pore mène à l'apoptose ou à la nécrose<sup>61</sup>. Plusieurs études ont montré un dysfonctionnement de ce pore<sup>61-63</sup>. En effet, la suppression de cyclophilin D ou l'inhibition du pore par le GNX-4728 montre une capacité de tampon de la mitochondrie augmentée et maintenue pendant la maladie, une synthèse d'ATP augmentée, une vacuolisation des mitochondries réduite, et une suppression de la mort neuronale<sup>61-63</sup>. Ce pore est donc impliqué dans la difficulté de la mitochondrie à remplir son rôle de tampon calcique, et, plus largement, dans le dysfonctionnement mitochondrial.

Le mécanisme d'action de la protéine SOD1 sur les mitochondries est encore mal connu. On sait que la protéine peut interagir avec la mitochondrie via des protéines sur la surface externe de la mitochondrie. C'est le cas de l'interaction de la protéine SOD1 mutée avec Bcl2. En effet, Pedrini et al.<sup>64</sup> ont montré que l'incubation de protéines SOD1 mutées sur mitochondries saines isolées induit un relargage de cytochrome C de la mitochondrie. La même expérience réalisée sur des mitochondries de cellules construites sans Bcl2 empêche la libération du cytochrome C. Donc la toxicité de SOD1 sur la mitochondrie agit en partie via Bcl2. La protéine SOD1 peut également pénétrer dans l'espace intermitochondrial (espace entre membrane interne et membrane externe de la mitochondrie)<sup>51,65,66</sup>. Magrané et al.<sup>54</sup> et Igoudjil et al.<sup>67</sup> ont montré qu'elle est toxique également dans ce compartiment. Magrané et al. ont généré une lignée de motoneurones dont la protéine SOD1 mutée n'est présente que dans l'espace intermitochondrial. Ils montrent que la protéine a pour effet de créer des dysfonctionnements métaboliques, un stress oxydatif, une dynamique mitochondriale altérée<sup>54</sup>. In vivo, Igoudjil et al.<sup>67</sup> ont utilisé des souris qui n'expriment la protéine mutée que dans l'espace intermitochondrial. Ils démontrent que l'action de la protéine dans ce compartiment crée une faiblesse musculaire, une perte de poids, des problèmes moteurs, la mort de motoneurones, un métabolisme altéré, mais pas de dénervation musculaire. Ils montrent ainsi que la protéine agit en partie sur la mitochondrie pour déclencher la SLA, mais que sa toxicité n'est pas limitée à cet organe.

### 1.4.2.3 RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET SLA

#### FONCTION DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET STRESS

Le réticulum endoplasmique (RE) a un rôle crucial dans la cellule pour l'homéostasie cellulaire et la survie, le repliement des protéines, la biosynthèse lipidique, et l'homéostasie calcique et oxydative. Un stress du réticulum endoplasmique se manifeste par une synthèse protéique augmentée, une



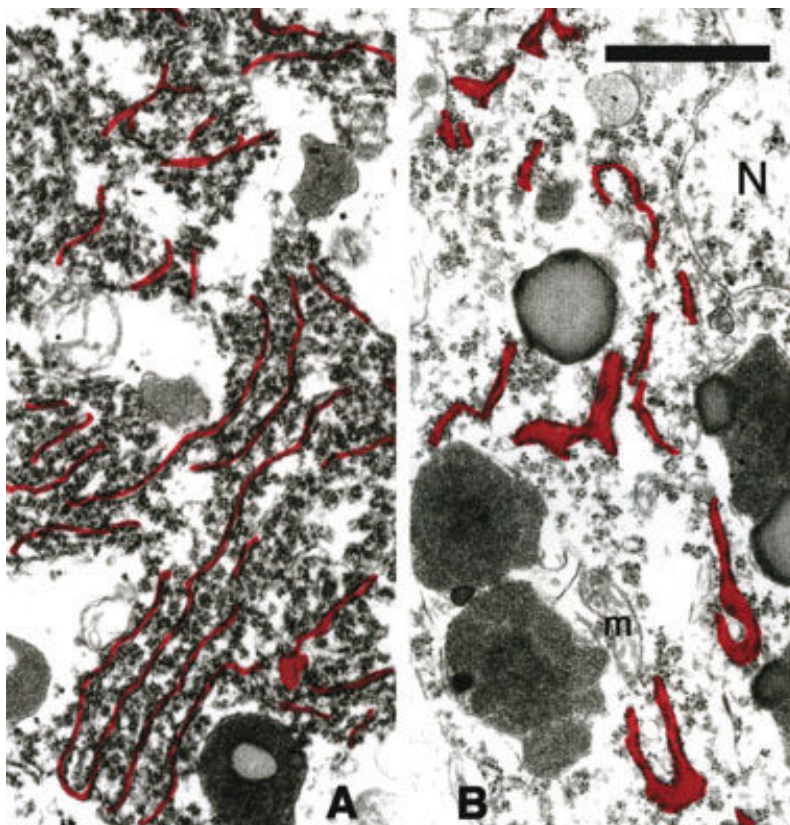
accumulation de protéines mal repliées, une altération de la balance calcique et oxydative<sup>68</sup>. Lorsque ce stress est présent, et pour lutter contre, le réticulum développe une réponse appelée UPR (*unfolded protein response*). Cette réaction a pour but de diminuer le stress du réticulum. Deux actions sont mises en place. La première est d'augmenter l'élimination des protéines mal conformées, et d'augmenter la capacité de repliement des protéines du réticulum en augmentant l'expression de protéines chaperonne. La deuxième est d'inhiber la traduction des ARNs des protéines. Cette deuxième action évite un engorgement du réticulum. Il existe 3 cascades de réaction dans l'UPR, chacune activée par une molécule transmembranaire exprimée à la surface du RE : PERK, IRE1 et ATF6<sup>68</sup>. Si le stress du réticulum endoplasmique est prolongé, l'UPR initie la mort cellulaire.

#### IMPLICATION DU RE DANS LA SLA

Le stress du RE et l'activation de l'UPR ont été mis en évidence dans les moelles épinières de patients<sup>69</sup>, dans les muscles de souris SOD1<sup>70</sup>, dans les moelles épinières de rongeurs SOD1<sup>69,71</sup>, et sur des cultures de cellules exprimant la protéine SOD1 mutée<sup>72</sup>. Chaque fois, il a été mis en évidence l'augmentation du nombre de protéines chaperonnes, et l'activation des trois voies de l'UPR (PERK, IRE1, ATF6). Dans les souris SOD1, la présence de facteurs de *stress* est remarquée dès la naissance. L'activation de l'UPR est plus tardive, le moment exact est controversé : certains montrent une activation pré-symptomatique<sup>69</sup>, d'autres montrent que l'UPR commence avec les symptômes et ce jusqu'au stade final de la maladie<sup>71</sup>. Cette différence de temps peut être due au fait que ces analyses englobent tous les neurones, voire toutes les cellules de la moelle ventrale. Pour étudier le stress du RE dans les motoneurones uniquement, Saxena et al.<sup>73</sup> ont réalisé une étude intéressante dans laquelle ils ont, grâce à des microdissections lasers, isolé les motoneurones. Ils ont également différencié les motoneurones vulnérables à la maladie (ceux qui dégénèrent les premiers, de type *Fast*), et les motoneurones résistants (ceux qui dégénèrent plus tardivement, ou ne dégénèrent pas, de type *Slow*)<sup>73</sup>. Ils

montrent une susceptibilité au stress du réticulum plus importante dans les motoneurones vulnérables, et la présence d'un stress du réticulum dans ces motoneurones dès la naissance, qui augmente avec l'âge. Enfin, seuls ces motoneurones activent l'UPR à partir de P30. Le stress du RE est néfaste pour les motoneurones. En effet, le stress du réticulum dans les souris SOD1 active une protéine Bim qui recrute Bax dans les mitochondries, provoquant le relargage du cytochrome C et l'induction de l'apoptose<sup>72</sup>. Le stress du RE peut également recruter la voie des caspases 12 pour induire l'apoptose de la cellule<sup>71</sup>. L'application d'un inhibiteur de stress, le salubrinal, atténue les manifestations de la maladie et ralentit sa progression<sup>73</sup>.

Outre ces difficultés fonctionnelles, le RE a une morphologie modifiée par la maladie. Des observations en microscopie électronique de moelles épinières de



patients atteints de SLA sporadique montrent une distension du lumen du réticulum, et une perte des ribosomes qui y sont accrochés<sup>74,75</sup> (Figure 5).

**Figure 5 : Distension et perte ribosomale de RE de cellules de la corne antérieure de patients atteints de SLA. A : Contrôle. B : Distension et fragmentation de la citerne du RE. Les citernes sont coloriées en rouge. N : noyaux, m : mitochondrie. Barre = 1µm. Adapté de Oyanagi et al, 2008<sup>74</sup>.**

Comme la mitochondrie dans les motoneurones, le RE a un rôle de tampon calcique. Il capte le calcium intracellulaire afin d'augmenter le gradient de calcium entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. A chaque potentiel d'action, il relargue du calcium dans le cytosol avant de le capturer à nouveau. Or, il a été

montré que la SLA génère une déplétion calcique du RE<sup>76,77</sup>. La concentration calcique du cytosol se retrouve augmentée, ce qui explique en partie les difficultés qu'éprouve la mitochondrie à réguler l'homéostasie calcique. Au sein du RE, la déplétion calcique peut être un facteur déclenchant un stress et une mal conformation des protéines<sup>77</sup>.

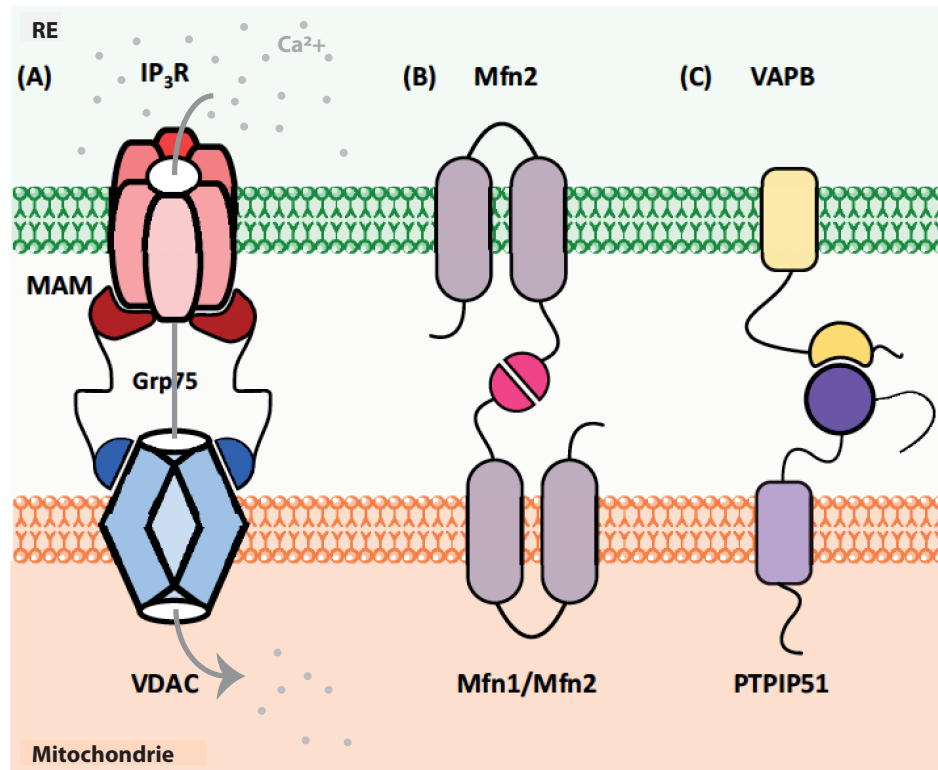
Ainsi le RE est stressé au cours de la maladie, et l'UPR est activé afin de répondre à ce stress. Mais on peut se demander comment la protéine SOD1, qui est une protéine mitochondriale, agit sur le RE. Peu d'études ont été réalisées sur le lien direct entre la mutation et le stress du RE, mais on sait que les inclusions de protéines SOD1 cytosoliques sont ubiquitinées et repérées par le RE comme des protéines mal conformées. Leur forte concentration dans le cytosol déclenche alors l'UPR<sup>71,72</sup>. Kikuchi et al.<sup>71</sup> montrent également que des protéines SOD1 mutées s'accumulent dans le RE, et interagissent avec une protéine chaperonne BiP<sup>71</sup>. Or BiP est impliqué dans le stress du réticulum. Donc SOD1 pourrait déclencher le stress du RE par sa présence à l'intérieur de celui-ci. SOD1 est une protéine toxique par ses agrégats intracellulaires, mais elle agit également de manière directe sur la mitochondrie et sur le réticulum.

#### 1.4.2.4 ZONES DE CONTACTS RE-MITOCHONDRIE (MAM)

##### STRUCTURE ET ROLE DES MAM

Pour effectuer leurs nombreuses fonctions, les mitochondries nécessitent des communications et échanges avec d'autres organites. En particulier, elles s'associent avec le RE : 5-20% de la surface mitochondriale est en apposition étroite avec le RE (10-30 nm de distance). Ces contacts sont appelés MAM (*mitochondrial associated-ER membrane*). Plusieurs protéines sont impliquées dans la structure de ces MAM pour accoler RE et mitochondrie : MFN2 est localisé sur le RE et sur les mitochondries (Figure S1). Les deux molécules sur chaque organite s'associent pour lier la mitochondrie avec le RE<sup>78</sup>. VAPB, situé sur le RE,

se lie à PTPIP51 situé sur la mitochondrie<sup>79</sup>. Le canal IP3R se lie à VDAC : ces deux canaux permettent le passage du calcium entre RE et mitochondrie.



**Figure S1 : Structure des MAM entre mitochondries et reticulum.** **A** : Communication calcique du RE à la mitochondrie via les canaux IP<sub>3</sub>R et VDAC. **B-C** : Accolement du RE et de la mitochondrie par les protéines Mitofusines (B) et l'interaction VAPB-PTPIP51 (C). Adapté de Paillusson et al, 2016<sup>80</sup>.

Les MAM ont plusieurs rôles. D'abord, ils permettent des flux calciques du RE à la mitochondrie. Le calcium est nécessaire à la mitochondrie pour générer l'ATP puisque de nombreuses enzymes de la respiration sont régulées par le Ca<sup>2+</sup>. L'apposition avec le RE permet de capturer rapidement du calcium. De plus, en situation de stress, le RE transmet son stress et induit l'apoptose à travers le calcium. En effet, une concentration calcique trop importante dans la mitochondrie ouvre le mPTP et induit l'apoptose<sup>80</sup>. Les MAM ont aussi probablement un rôle à jouer dans le stress du RE et dans l'UPR. MFN2 et VAPB, deux protéines impliquées dans la connexion entre le RE et la mitochondrie dans un MAM, sont des modulateurs de l'UPR<sup>81,82</sup>. Une autre fonction des MAM est de permettre l'échange de phospholipides entre RE et mitochondrie<sup>80</sup>. Aussi, de

manière intéressante, les MAM aideraient mitochondries et RE à se déplacer ensemble dans la cellule lorsque les mitochondries sont transportées le long des microtubules<sup>80,83</sup>. Ce co-déplacement est judicieux pour assurer une localisation rapprochée permanente des mitochondries et du RE et permettre une communication rapide entre ces deux organites, en particulier lorsqu'il s'agit de déplacement le long des dendrites et des axones. Enfin, les MAM seraient éventuellement impliqués dans la dynamique mitochondriale. Les fissions ont lieu aux endroits où sont présents les MAM ; le RE serait un constricteur de la mitochondrie<sup>84</sup>. MFN2, protéine de structure des MAM, contrôle la fusion<sup>80</sup>.

### **IMPLICATION DES MAM ET LA SLA**

Peu d'études encore ont été réalisées sur les MAM dans la SLA, encore moins sur le modèle SOD1. De manière générale, les MAM sont altérés dans les maladies neurodégénératives : Alzheimer, Parkinson, SLA<sup>80</sup>. Dans la SLA, les mutations portant sur les gènes de TDP43 et FUS désorganisent les MAM en cassant les liaisons VAPB-PTPIP51<sup>79,80</sup>. La perte de fonction de SIGMAR1 liée à une mutation portant sur le gène SIGMAR1 et menant à une forme juvénile de SLA désorganise également les MAM<sup>85</sup>. Une mutation sur le gène codant pour la protéine VAPB entraîne la SLA<sup>86</sup>, mettant en avant l'importance des MAM dans la SLA. Enfin, l'unique étude publiée sur le modèle SOD1 montre que l'accumulation de protéine mutée SOD1 cause une désorganisation et un effondrement des MAM. Cette désorganisation conduit à une dispersion des canaux IP3R3 qui s'accumulent normalement aux MAM pour permettre le flux calcique<sup>87</sup>. Ainsi la mutation SOD1 crée non seulement une désorganisation des MAM, mais celles-ci deviennent non fonctionnelles puisque le calcium ne peut plus circuler du RE aux mitochondries.

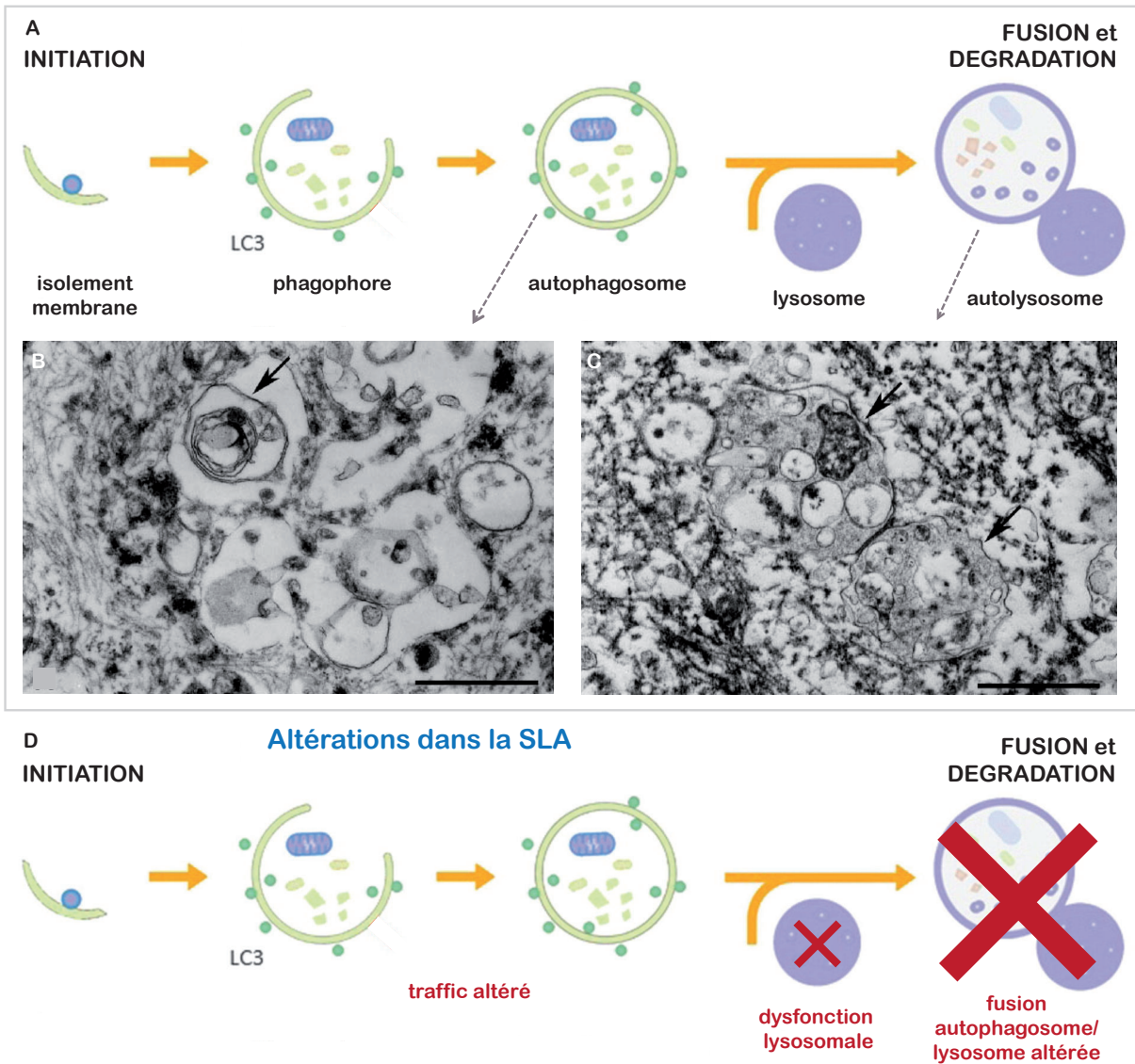
### 1.4.2.5 AUTOPHAGIE ET SLA

#### MECANISME D'AUTOPHAGIE

L'autophagie est un mécanisme de dégradation des agrégats, des protéines altérées et organites dysfonctionnels. Il implique l'étiquetage de ces altérations, leur regroupement et la dégradation par l'activité enzymatique des lysosomes. Trois formes d'autophagie existent : l'autophagie médiée par des chaperons, la microautophagie et la macroautophagie<sup>88</sup>. Nous parlerons dans cette thèse de macroautophagie, que l'on appelle communément autophagie. Ce mécanisme commence par l'isolement de membrane provenant de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique (Figure 6). La membrane s'étire ensuite pour former une vésicule à double membrane appelée phagophore. Les organites et agrégats à éliminer sont étiquetés par la molécule LC3, qui se lie elle-même au phagophore, piégeant les organites lors de la fermeture du phagophore. La vacuole à double membrane est caractéristique des autophagosomes. La maturation de l'autophagie se poursuit par la fusion de l'autophagosome et d'un lysosome.

#### DEREGLEMENT DU MECANISME DE L'AUTOPHAGIE DANS LA SLA

De nombreuses mutations de gènes impliqués dans l'autophagie sont reportées dans la SLA. Par exemple, une mutation sur le gène ALS2 empêche la fusion des endosomes avec les autophagosomes<sup>89</sup>, ou la mutation CHMP28 qui empêche le trafic des endolysosomes<sup>90</sup>. La mutation sur le gène codant pour la dynactine bloque également le processus d'autophagie en altérant le trafic des vacuoles d'autophagie<sup>91</sup>.



**Figure 6 : Mécanisme de l'autophagie dans les neurones, et détérioration du processus dans la SLA.** **A** : Processus de l'initiation à la fusion et dégradation en passant par la formation d'autophagosome. **B** : Autophagosome (flèche) observé en microscopie électronique, entouré d'une double membrane. **C** : Autolysosome (flèches) observés en microscopie électronique. **D** : Arrêt du processus d'autophagie à différentes étapes dans la pathologie de la SLA. Les défauts du complexe dynéine/dynactine altèrent le trafic des autophagosomes, et les dysfonctionnements de l'activation du flux autophagique et de la fonction lysosomale sont marqués par les croix rouges, comme étant les principaux défauts de l'autophagie dans la SLA. Modifié de Cipolat Mis et al.<sup>88</sup> et Sasaki<sup>92</sup>.



De manière globale, de nombreux dysfonctionnements de l'autophagie sont reportés dans la SLA. Des immunohistochimies et des analyses par immunoempreinte montrent une augmentation de beclin, un régulateur de l'induction de l'autophagie<sup>93</sup>, et des vacuoles marquées par LC3<sup>88,94,95</sup>. Les autophagosomes marqués par p62 s'accumulent, et montrent en microscopie électronique des grandes vacuoles accumulant de nombreuses structures<sup>92,95</sup>. Xie et al.<sup>95</sup> montrent de manière intéressante que ces vacuoles s'accumulent parce qu'il y a une réduction du nombre de lysosomes au niveau du soma dans les souris SOD1 dès P40, et que le transport des vacuoles d'autophagie est altéré dans les dendrites et les axones<sup>95</sup>. Ainsi la mutation SOD1 augmente l'autophagie mais le flux est bloqué.

Deux études montrent que stimuler l'autophagie par du lithium<sup>50</sup> ou du tréhalose<sup>96</sup>, deux activateurs de l'autophagie, est bénéfique pour les souris SOD1 : la survie est prolongée, la perte de motoneurones est diminuée, les mitochondries ne se vacuolisent plus et retrouvent une morphologie normale.

Ces études mettent donc en avant un dysfonctionnement de l'autophagie dans la SLA. Pour la mutation SOD1 en particulier, l'autophagie est fortement affectée<sup>94</sup>, ceci peut être dû à l'accumulation d'agrégats cytoplasmiques, mais également à l'interaction entre la SOD1 mutée et Beclin1, un régulateur de l'autophagie, qui a été mise en évidence par Nassif et al.<sup>93</sup>.

## MITOPHAGIE ET SLA

Plusieurs types d'autophagie sont déclinés selon les organites à éliminer : mitophagie pour les mitochondries, réticulophagie pour le réticulum, pexophagie pour les peroxysomes... Ces voies d'autophagie spécifiques diffèrent par les protéines qui déclenchent l'autophagie et lie ces organites défectueux à la machinerie. Pour la mitophagie spécifiquement, la protéine PINK identifie les mitochondries endommagées. PARKIN recrute alors les mitochondries marquées par PINK pour les conduire dans l'autophagie<sup>97</sup>.



Dans la SLA, aucune étude n'a été faite sur la mitophagie. En revanche, la protéine PARKIN est protectrice dans les souris SOD1 : Yung et al.<sup>98</sup> ont montré qu'elle promeut l'élimination des agrégats SOD1.

#### 1.4.2.6 ALTERATION DES TRANSPORTS

Les dendrites et l'axone contiennent une accumulation anormale de neurofilaments, des mitochondries abimées (voir section 1.4.2.2) et des autophagosomes (voir section 1.4.2.6)<sup>99</sup>. Cette accumulation suggère que des défauts de transport axonal sont impliqués dans la pathogénèse de la maladie. En effet, par hybridation in situ de gènes de patients, le gène *dynactin-1* a été trouvé comme largement sous régulé dans les motoneurons de patients sALS<sup>99</sup>. Le gène *dynactin-1* code pour le complexe multiprotéique de la dynactine qui lie la dynéine à des vésicules et organites pour qu'ils soient transportés de manière rétrograde dans les dendrites et axones. C'est la dynéine qui ensuite est le moteur du transport, conduisant son cargo le long des microtubules. Cette sous-régulation commence avant l'accumulation des neurofilaments dans les dendrites et axones, suggérant que l'accumulation de ces neurofilaments est bien due à des problèmes de transport. De plus des mutations sur les gènes impliquant le complexe dynéine/dynactine mènent à la dégénérescence des motoneurons chez des patients SLA et dans des modèles de souris<sup>91,100</sup>.

Les microtubules sont également touchés par la maladie, affectant aussi le transport des organites et vésicules de manière rétrograde et antérograde. Une mutation affectant la tubuline, une protéine des microtubules, crée à elle seule le développement de la maladie<sup>101</sup>. Plus généralement, dans les cas familiaux et sporadiques de la maladie, des études récentes montrent que les microtubules subissent non seulement une désorganisation, mais également des altérations dans leur phénomène d'instabilité dynamique : la croissance rapide et le rétrécissement des polymères de microtubule. Ceci est du essentiellement à des altérations des MAP (protéines associées aux microtubules) qui régulent la stabilité des microtubules<sup>101</sup>. Dans les souris SOD1 par exemple, la protéine

mutée SOD1 augmente la dynamique de polymérisation-dépolymérisation des microtubules, réduisant le transport. Elle se lie également à la dynéine, empêchant son accrochage avec sa vésicule cargo<sup>102</sup>. La dérégulation du calcium cytosolique affecte également les microtubules en tendant à les dépolymériser<sup>103</sup>.

### 1.4.3 CELLULES GLIALES

Les cellules gliales ont un rôle de support pour les motoneurones : elles régulent l'homéostasie synaptique, servent de barrière hémato-encéphalique, fournissent de l'énergie au motoneurone, protègent ou éliminent les motoneurones endommagés<sup>104-106</sup>.

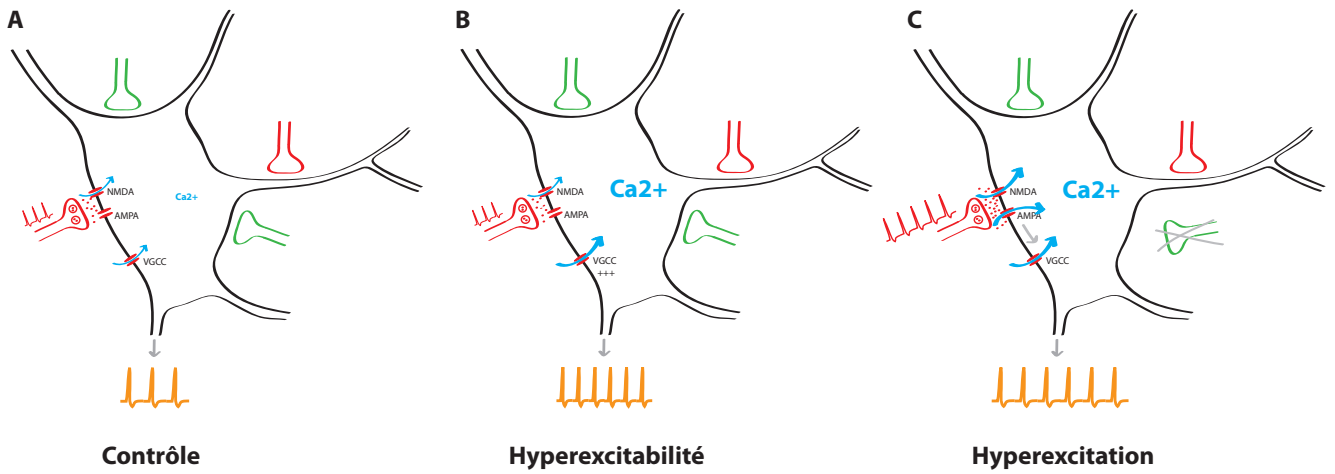
Les trois types de cellules gliales : astrocytes, microglie et oligodendrocytes, sont touchés par la maladie. Elles expriment toutes les trois la protéine SOD1 mutée<sup>104-106</sup>. Sa toxicité agit sur les cellules gliales et les endommage : c'est le cas des oligodendrocytes qui rentrent en apoptose sous l'action de la SOD1 mutée<sup>106</sup>. Mais l'action de la protéine rend également les cellules gliales toxiques pour les motoneurones. En effet, la réduction de l'expression de la SOD1 mutée spécifiquement dans les astrocytes ou dans la microglie ralentit la progression de la maladie, même si l'âge du début des symptômes est inchangé<sup>104,107</sup>. Les astrocytes sont toxiques pour le motoneurone dans la SLA parce que sous l'action de la SOD1 mutée, ils libèrent dans l'espace extracellulaire de l'oxyde nitrique (NO), et la protéine SOD1 mutée elle-même<sup>104</sup>. Aussi, leur rôle à la synapse tripartite est compromis : la faible expression des transporteurs EAAT2 à la surface membranaire empêche la recapture du glutamate et rend le motoneurone plus susceptible à une toxicité du glutamate<sup>108</sup>. Quant à la microglie, en condition physiologique, elle peut s'activer sous deux formes : un phénotype M2 qui a pour but de produire des facteurs trophiques et anti-inflammatoires afin de promouvoir la survie neuronale, et un phénotype M1 qui produit des ROS, du NO et des cytokines afin d'abimer le neurone et de l'éliminer<sup>105</sup>. Dans la SLA, les deux phénotypes sont mis en place. A un stade présymptomatique, le phénotype M2 est majoritaire, la microglie est alors

protectrice et ralentit la progression de la maladie. A un stade symptomatique et au delà, le phénotype M1 est majoritaire, la microglie libère des cytokines et des molécules toxiques qui inflammant le motoneurone et accélèrent sa dégénérescence<sup>105</sup>. Enfin, les oligodendrocytes participent à la dégénérescence axonale. Ils n'expriment plus le transporteur monocarboxylate MCT1, dont le rôle est de transmettre à l'axone le lactate que les oligodendrocytes prélèvent dans les capillaires sanguins<sup>106</sup>. Ils participent ainsi aux dysfonctionnements métaboliques et à la déplétion d'ATP des motoneurones.

#### 1.4.4 CHANGEMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES -HYPOTHESE DE L'EXCITOTOXICITE

De nombreux autres modèles de SLA possèdent des mécanismes communs à ceux observés dans les souris SOD1<sup>109</sup> : désorganisation du cytosquelette et problèmes de transports, défauts de mitochondries et difficulté à produire de l'ATP, excès de calcium dans le cytoplasme... Ces dysfonctionnements sont donc généraux, et il est intéressant de comprendre non pas le mécanisme qui lie la protéine SOD1 mutée à la mort des motoneurones, mais les liens qui existent entre ces dysfonctionnements menant à la mort cellulaire quelle que soit la mutation originelle de la maladie. Une hypothèse permettant de lier plusieurs de ces dysfonctionnements serait qu'il existe une excitotoxicité au sein du motoneurone. Selon cette hypothèse, une entrée massive de calcium dans les motoneurones pourrait être toxique et provoquer la dégénérescence. Une forte concentration de calcium expliquerait la dégénérescence mitochondriale, le stress du réticulum endoplasmique, la mort du motoneurone... Le calcium peut entrer dans les neurones de nombreuses façons : suite à l'activation de canaux à ligands (AMPA, NMDA), de canaux voltage dépendants, ou de canaux activés par des messagers (IP3, protéines G) (Figure 7A). Ainsi une excitotoxicité peut émaner des modifications de propriétés intrinsèques, où une même stimulation donne naissance à plus de potentiels d'action, c'est l'**hyperexcitabilité** (Figure 7B). Une excitotoxicité peut aussi être provoquée par un déséquilibre de la

balance excitation/inhibition des synapses projetant sur le motoneurone, au profit de l'excitation, conférant une **hyperexcitation** (Figure 7C).



**Figure 7 : Origine de l'augmentation du calcium intracellulaire dans l'hypothèse de l'excitotoxicité : hyperexcitabilité et/ou hyperexcitation.**

**A :** Schéma d'un motoneurone innervé par des afférences excitatrices (rouge) et inhibitrices (vert). L'arrivée de potentiels d'action d'une afférence excitatrice déclenche la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ceux-ci activent les récepteurs AMPA qui eux-mêmes activent les récepteurs NMDA. Les récepteurs NMDA sont perméables au calcium. L'entrée d'ions sodium via les récepteurs AMPA et NMDA déclenche un PPSE puis éventuellement un potentiel d'action. A chaque potentiel d'action, du calcium entre dans la cellule par les canaux voltage dépendants VGCC. **B :** En cas d'hyperexcitabilité, la cellule est plus excitable, c'est-à-dire que pour un même input, elle va générer plus de potentiels d'action. Les canaux voltage dépendants du calcium sont donc plus activés et une plus grande quantité de calcium entre dans la cellule, susceptible de créer un stress excitotoxique. **C :** En cas d'hyperexcitation, la balance des entrées synaptiques reçue par les motoneurones est modifiée pour plus d'excitation, soit par changement du nombre de synapses (dans cet exemple moins de synapses inhibitrices), soit par changement de l'activité des synapses (dans cet exemple des interneurones excitateurs hyperexcités et/ou un changement de structure des récepteurs AMPA les rendant perméables au calcium). Comme le motoneurone est plus excité, il décharge plus de potentiels d'action, activant également de manière plus importante les canaux voltage dépendants perméables au calcium.

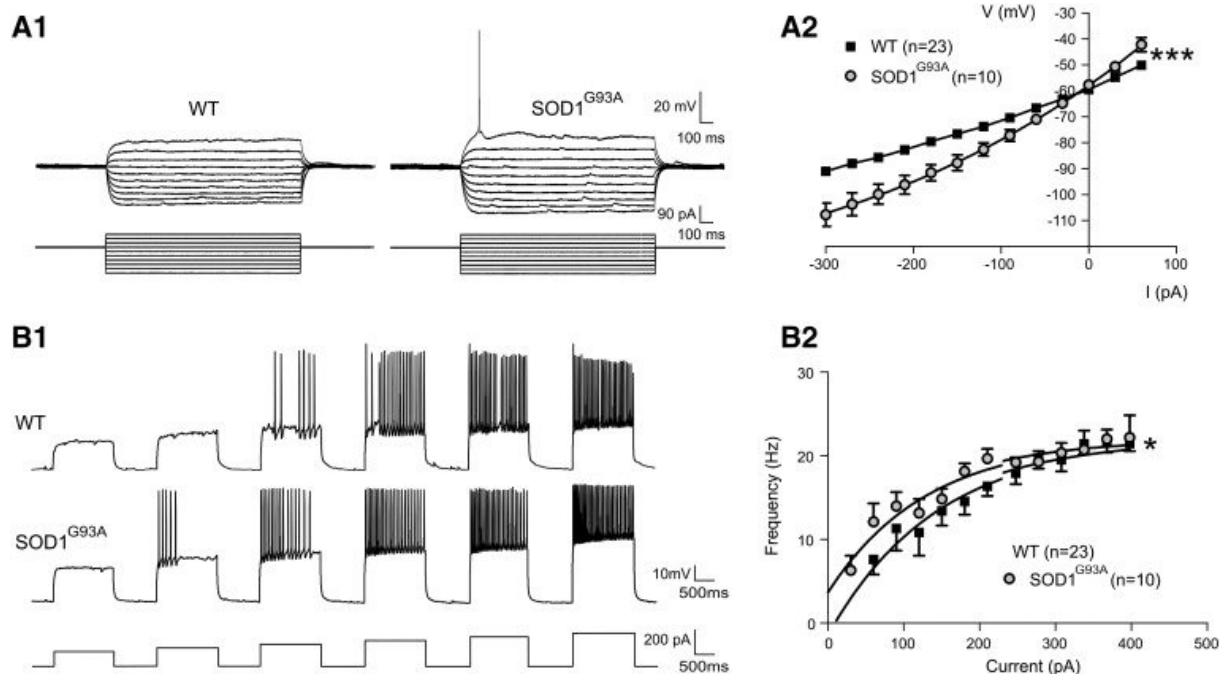
#### 1.4.4.1 HYPOTHESE DE L'EXCITOTOXICITE DANS LA SLA

Plusieurs arguments ont été avancés en faveur de l'hypothèse de l'excitotoxicité comme contribuant à la dégénérescence des motoneurones dans la SLA. Tout d'abord, le seul médicament actuellement efficace pour ralentir l'évolution de la maladie est le riluzole. Son mode d'action exact est mal connu mais on sait qu'il agit sur la libération de glutamate et qu'il diminue les PIC (courants entrants persistants), donc il diminue à la fois l'excitation reçue par les neurones et son excitabilité<sup>110</sup>. Un autre argument est montré par des stimulations magnétiques transcraniales (TMS) réalisées sur des patients atteints de SLA et des patients contrôles. Les seuils de stimulation sont plus faibles chez les patients SLA, démontrant une hyperexcitabilité des réseaux neuronaux<sup>111</sup>. De plus, les transporteurs astrocytaires du glutamate (EAAT2) sont déficients dans la SLA, la recapture du glutamate libéré dans la fente synaptique est alors moins efficace<sup>108,112</sup>. Nous avons également vu plus haut que le réticulum et la mitochondrie sont altérés dans la SLA et ils ne remplissent plus leur rôle de tampon calcique correctement. Enfin, les motoneurones innervant les fibres musculaires FF, plus vulnérables à la maladie, expriment moins de protéines tampons calciques dans le cytosol, et augmentent leur concentration cytoplasmique de calcium au cours de la maladie<sup>34</sup>. En comparaison, les motoneurones oculomoteurs, qui ont une forte concentration de protéines chélatrices de calcium, ne sont pas du tout affectés par la SLA<sup>113</sup>. Il pourrait donc y avoir une hausse de la concentration calcique cytosolique. Pour chercher l'origine de cette concentration, des études ont été réalisées sur l'hyperexcitabilité du motoneurone, et sur son hyperexcitation.

#### 1.4.4.2 HYPEREXCITABILITE

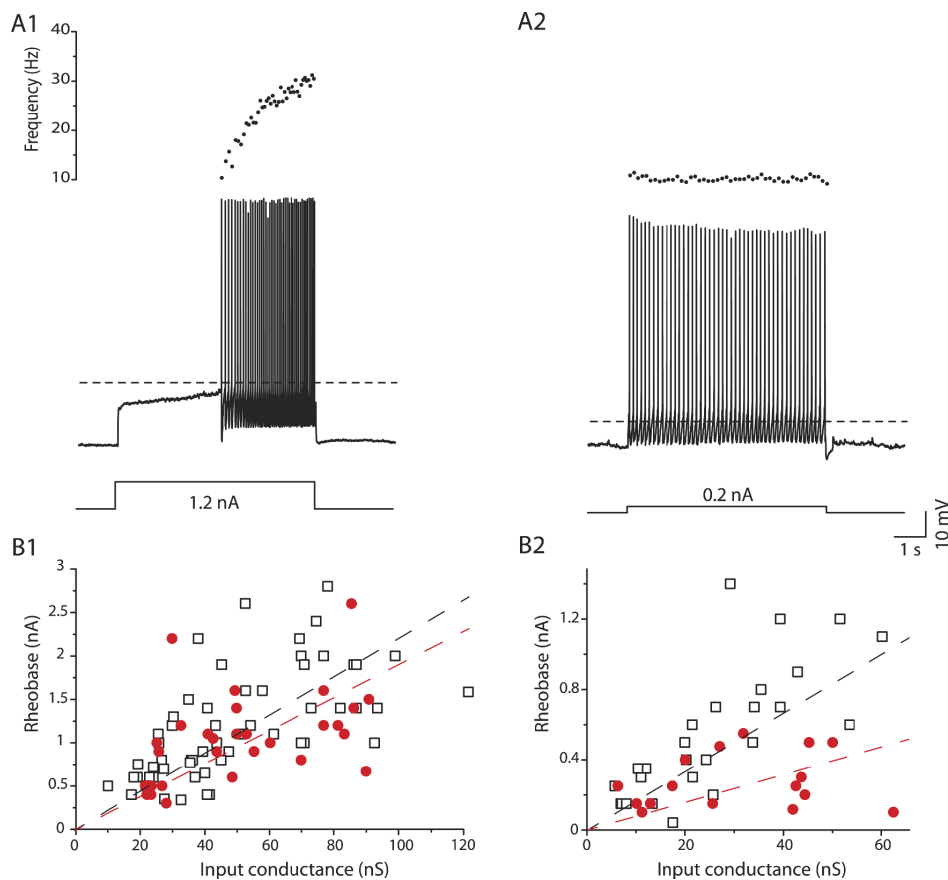
A des stades pré-symptomatiques, de nombreuses études ont démontré une hyperexcitabilité des motoneurones de souris atteintes de SLA, et cela dès un stade embryonnaire. Des motoneurones en culture à un stade embryonnaire sont

recrutés à un courant plus faible que des motoneurones de souris saines, et la pente de la courbe I-F (fréquence de décharge en fonction de l'intensité du courant injecté) est plus forte<sup>114,115</sup>. De même, cette fois dans une préparation in vitro de moelle épinière embryonnaire, Martin et al.<sup>116</sup> ont démontré, en enregistrant la réponse en voltage des motoneurones à des injections de créneaux de courant, que les motoneurones de souris SOD1 ont une résistance plus élevée que les motoneurones WT (Figure 8A). Ils montrent également un gain (pente de la courbe I-F) augmenté (Figure 8B). Ils démontrent ainsi une hyperexcitabilité neuronale précoce des motoneurones SOD1.



**Figure 8 : Hyperexcitabilité des MNs SOD1<sup>G93A</sup> à E17,5.** **A<sub>1</sub>** : Enregistrements de potentiels de membrane en réponse à des créneaux de courants dans les MNs WT et SOD1<sup>G93A</sup>. Noter que, lors de l'injection du plus important créneau de courant positif, le MN SOD1<sup>G93A</sup> émet un potentiel d'action alors que le MN WT reste silencieux. **A<sub>2</sub>** : Courbe moyenne courant-voltage des MNs WT (carrés noirs) et SOD1<sup>G93A</sup> (cercles gris), montrant l'augmentation de résistance des MNs SOD1<sup>G93A</sup> (pente plus raide). **B<sub>1</sub>** : Potentiels de membrane caractéristiques (haut) en réponse à des stimulations en créneaux de courants d'intensité croissante (bas). **B<sub>2</sub>** : Fréquence moyenne des potentiels d'action, selon l'intensité, montrant l'hyperexcitabilité des MNs SOD1<sup>G93A</sup> (mêmes symboles qu'en A<sub>2</sub>). Modifié de Martin et al, 2013<sup>116</sup>.

Leroy et al.<sup>117</sup> ont été les premiers à corréler les propriétés intrinsèques des motoneurones de nouveau-nés en fonction de la vulnérabilité différentielle des motoneurones. Sur des tranches de moelle de souris SOD1, ils démontrent qu'il existe déjà des différences de propriétés intrinsèques entre deux types de motoneurones : les motoneurones à décharge immédiate et les motoneurones à décharge retardée (Figure 9A).



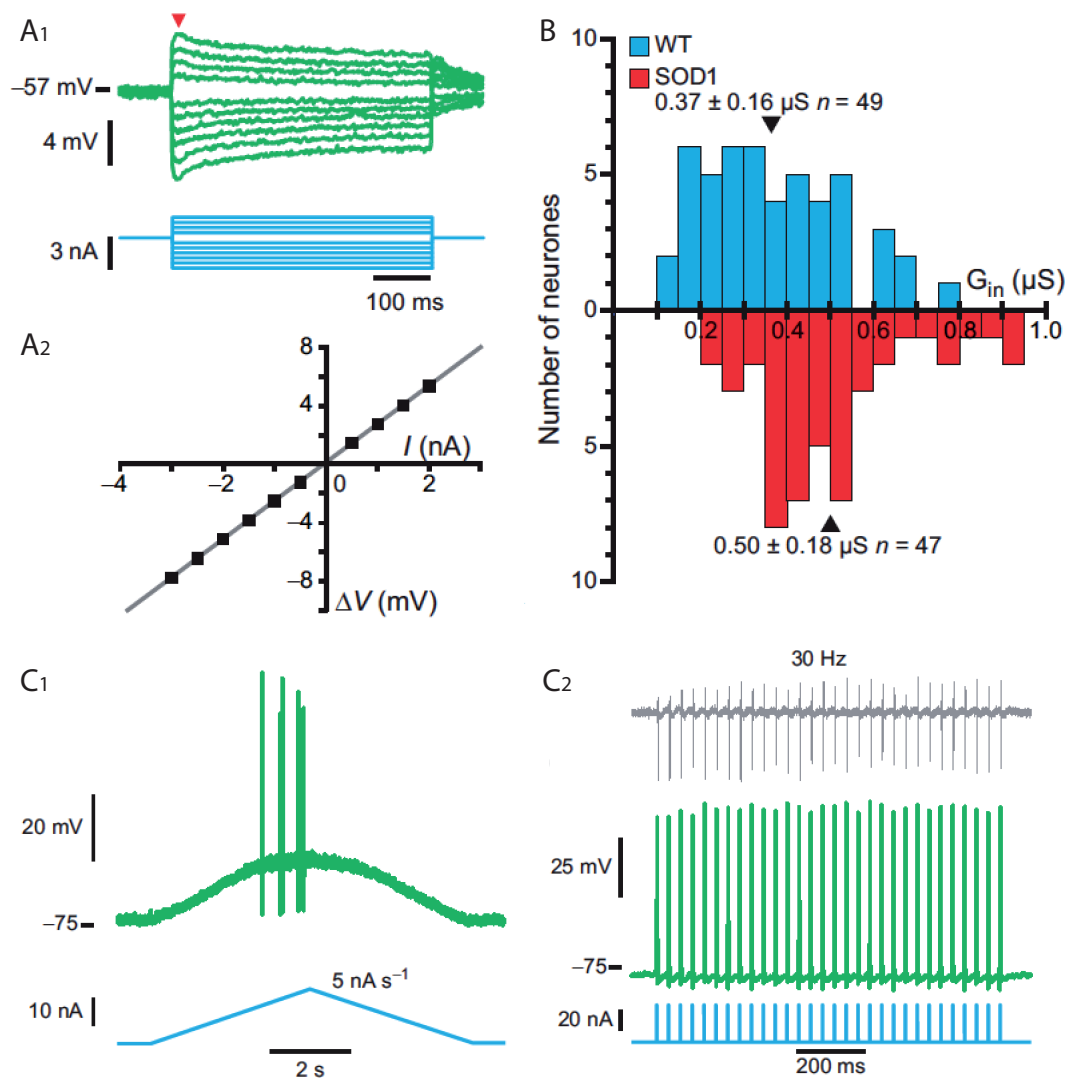
**Figure 9 : Les motoneurones mSOD1 à décharge immédiate sont sélectivement hyperexcitables chez le souriceau (P6-P10). A1-2 :** Exemples de motoneurones mSOD1 dont le modèle de décharge est retardé (A1), et ceux dont le modèle de décharge est immédiat (A2). Le courant indiqué est l'intensité minimale nécessaire à évoquer une décharge (rhéobase). Bas :

courant injecté (créneaux), milieu : réponse du voltage, haut : fréquence de décharge instantanée. La ligne horizontale pointillée montre le seuil de décharge (-37mV pour les motoneurones à décharge retardée, -48mV pour les motoneurones à décharge immédiate). **B1-2 :** Graphes de la rhéobase en fonction de la conductance d'entrée pour les motoneurones à décharge retardée (B1) et à décharge immédiate (B2). Dans chaque graphe, les carrés blancs sont les motoneurones WT et les points rouges sont les motoneurones mSOD1. Les régressions linéaires sont indiquées en pointillé. Modifié de Leroy et al, 2014<sup>117</sup>.

Ils démontrent qu'ils correspondraient, lorsqu'ils seront matures, respectivement, aux motoneurones de type S d'une part, et aux motoneurones de type F d'autre part. Enfin, ils montrent que seuls les motoneurones à décharge immédiate ont une excitabilité modifiée : leur rhéobase est plus faible, et leur seuil de décharge plus hyperpolarisé, ils sont donc hyperexcitables (Figure 9B)<sup>117</sup>. Ce résultat est intéressant, car il montre que l'hyperexcitabilité des motoneurones à un stade pré-symptomatique ne provoque pas leur dégénération. Au contraire, l'hyperexcitabilité à un stade pré-symptomatique pourrait être protectrice puisque ces mêmes motoneurones sont résistants à la maladie.

Les études faites chez l'adulte sont récentes puisque les méthodes pour étudier ces motoneurones sont récentes. Notamment, l'équipe de Daniel Zytnicki a développé une préparation *in vivo* permettant d'enregistrer intracellulairement des motoneurones dans la moelle épinière chez la souris adulte anesthésiée<sup>118</sup>. Grâce à cette préparation, Delestrée et al.<sup>119</sup> ont pu enregistrer *in vivo* des motoneurones spinaux. Par injection de créneaux de courants d'intensité croissante, ils ont tracé la droite courant-voltage dont la pente donne la résistance d'entrée (Figure 10A). Ils ont ainsi observé une augmentation de la conductance (Figure 10B), ce qui est en faveur d'une hypoexcitabilité des motoneurones. De plus, ils ont observé que certains motoneurones avaient du mal à décharger un train de potentiel d'action en réponse à l'injection d'une rampe lente de courant (Figure 10C), et cela avant la dénervation des jonctions neuromusculaires. Sur des tranches de moelle épinière de souris SOD1 G85R, Hadzipasic et al.<sup>120</sup> montrent que les motoneurones qui sont hypoexcitables, parce qu'ils ont un potentiel de repos plus hyperpolarisé, sont probablement les motoneurones FF. Ces motoneurones étant les premiers à dégénérer, on peut en conclure que l'hypoexcitabilité précède la mort des motoneurones dans la SLA.





**Figure 10 : Les motoneurones de souris SOD1 ne sont pas hyperexcitables chez l'adulte (P50).**

**A1** : Réponse moyennée (haut ; sur 5 séries) d'un motoneurone SOD1 à une série de créneaux de courant (bas). **A2** : Graphe de la déflexion du voltage ( $\Delta V$ , mesuré au pic de la réponse - flèche rouge), en fonction de l'intensité du courant de stimulation. **B** : Distribution de la conductance d'entrée ( $G_{in}$ ) des motoneurones WT (haut) et SOD1 (bas). Les flèches noires indiquent la moyenne. **C1** : Exemple d'un motoneurone SOD1 dont la décharge ne contient que quelques potentiels d'action, lors d'une stimulation par une rampe lente de courant. Haut : voltage, bas : courant. **C2** : Ce même motoneurone est en revanche capable d'émettre des potentiels d'action isolés (trace du milieu), en réponse à un train de brefs créneaux de courant (trace du bas). Sa jonction neuromusculaire est toujours fonctionnelle (trace du haut). Modifié de Delestrée et al., 2014.

Un autre modèle d'étude de la SLA utilisé mais controversé est la différenciation de fibroblastes de patients SLA en motoneurones (IPSC : *induced*

*pluripotent stem cells*). Cette technique est controversée car, la SLA étant une maladie qui évolue avec l'âge, il est difficile dans les IPSC de dire quel moment de la différenciation correspond à un stade pré-symptomatique dans les modèles animaux. Cependant, le grand avantage est de pouvoir travailler sur une population de motoneurones couvrant les différentes mutations conduisant à la SLA chez les patients. A quatre semaines de différenciation, Wainger et al.<sup>121</sup> ont noté que les IPSC de patients SLA déchargeaient spontanément plus souvent, bien qu'ayant une résistance d'entrée plus basse. Devlin et al.<sup>122</sup> ont également montré une hyperexcitabilité, car le gain de la courbe IF était augmenté dans les IPSC de patients SLA. Mais Devlin et al. ont étudié le maintien de l'excitabilité dans le temps, et montrent que l'hyperexcitabilité n'est que transitoire. Les courants potassiques et sodiques sont réduits, les motoneurones perdent leur capacité à décharger de manière répétitive. Sareen et al.<sup>123</sup> ont également observé une hypoexcitabilité après huit semaines de différenciation, car la fréquence de décharge des IPSC de patients était plus faible. Naujock et al.<sup>124</sup> expliquent l'hypoexcitabilité des IPSC par une diminution des courants sodiques par rapport aux courants potassiques.

Toutes ces études convergent donc pour décrire une hyperexcitabilité transitoire dans la SLA. Certains motoneurones perdent ensuite leur capacité à décharger de manière répétitive, peu avant leur dénervation neuromusculaire. L'évolution de l'excitabilité des motoneurones peut être expliquée par les courants entrants persistants (PIC : *persistent inward current*). Ceux-ci agissent de manière directe sur l'excitabilité du motoneurone, en s'activant lors de la dépolarisation de sa membrane<sup>125</sup>. Deux types de canaux sont impliqués : les canaux sodiques persistants, et les canaux calciques de type L (CaV 1.3). Les courants sodiques persistants sont préférentiellement présents sur le soma. Ils s'activent et se désactivent rapidement. Ces courants permettent d'augmenter la fréquence de décharge et de prolonger le plateau de décharge même après la fin du stimulus. Les courants calciques persistants sont plus lents, et situés sur les dendrites. Ils ont ainsi un rôle majeur pour amplifier les courants synaptiques<sup>125</sup>.

Dans les souris SOD1, les PIC sont augmentés à un stade post-natal<sup>115</sup>. Les deux types de courants persistants (sodiques et calciques) sont impliqués<sup>126</sup>. Des études sur des motoneurones en culture montrent également une augmentation des PICs, cette fois principalement d'origine sodiques<sup>127</sup>. L'augmentation des PIC survient à un âge où les motoneurones sont hyperexcitables. En revanche, à l'âge adulte, une étude *in vivo* réalisée en *voltage-clamp* suggère une diminution des PIC, pouvant expliquer que certains motoneurones ont du mal à maintenir une décharge répétitive chez les souris SOD1.

Ces résultats montrent donc que l'hyperexcitabilité n'est pas impliquée dans le processus de dégénération des motoneurones, au contraire elle serait protectrice. Si il y a une excitotoxicité dans les motoneurones atteints, elle ne provient pas d'un changement des propriétés intrinsèques du motoneurone.

#### 1.4.4.3 HYPEREXCITATION

Une excitotoxicité du motoneurone pourrait être due à une hyperexcitation d'origine synaptique, et ce par un dérèglement de la balance excitation-inhibition en faveur de l'excitation. Ceci peut se faire par une trop grande excitation, une diminution de l'inhibition, ou les deux. Plusieurs études immunohistochimiques ont permis de comptabiliser les synapses excitatrices et inhibitrices autour des somas des motoneurones de souris SOD1. Sunico et al.<sup>128</sup> ont observé que les motoneurones hypoglossaux de souris SOD1 présentent, à partir de P90 seulement, une modification de la balance synaptique excitation/inhibition à cause d'une perte de synapses inhibitrices<sup>128</sup>. Chang et al.<sup>129</sup> montrent également que la densité de synapses glycinergiques sur le soma de motoneurones lombaires semble se réduire dès P60<sup>129</sup>. Ces études montrent une diminution tardive du nombre de synapses, cette diminution n'est peut-être pas la cause de la dégénérescence des motoneurones. De plus, elles n'ont été réalisées que sur le soma. Or la grande majorité des synapses se trouve sur l'arborisation

dendritique des motoneurones<sup>130,131</sup>, donc elles ne reflètent pas la distribution moyenne synaptique.

La balance excitation-inhibition peut également être modifiée par l'efficacité des circuits corticaux et spinaux se projetant sur les motoneurones, indépendamment du nombre de leurs synapses. Peu d'études ont été réalisées chez l'adulte à cause des contraintes expérimentales : il faut en effet étudier les circuits pré-moteurs, et donc travailler dans des conditions physiologiques, *in vivo*. Ces contraintes rendent les études difficiles. Chez les patients SLA, des dysfonctionnements de circuits spinaux ont été mis en évidence, notamment dans les circuits sensoriels<sup>132</sup> et les voies cortico-spinales<sup>133</sup>. Dans les modèles murins, on observe dans le cortex que les neurones de la couche V ont une rhéobase plus faible. Ces neurones sont donc hyperexcitables dans les souris SOD1<sup>134</sup>. Dans la moelle épinière aussi, une hyperactivation des interneurones spinaux prémoteurs est suggérée chez les souris SOD1<sup>G93A</sup><sup>135</sup>. En parallèle, chez le poisson zèbre SOD1, McGown et al.<sup>136</sup> ont montré que les interneurones glycinergiques sont les premiers à évoquer des signes de stress, conduisant à une baisse des courants glycinergiques avant que les motoneurones ne commencent à être eux-mêmes stressés<sup>136</sup>. Martin et Chang<sup>137</sup> ont également montré chez la souris SOD1 une baisse de l'inhibition par une diminution des courants glycinergiques dans les motoneurones<sup>137</sup>. Enfin, un dernier argument mettant en avant le fait qu'il pourrait y avoir une excitotoxicité d'origine synaptique a été mis en évidence dans l'équipe au moment de mon arrivée au laboratoire. Les dendrites des motoneurones SOD1 se gonflent localement et les gonflements se vacuolisent. Cette observation a été faite sur des motoneurones âgés de 50 jours, donc avant le début de la dénervation. Un tel gonflement a déjà été observé dans des dendrites de neurones hippocampaux lors d'un stress excitotoxique<sup>138,139</sup>. En effet, l'ajout de NMDA dans le bain de neurones en culture fait gonfler de manière brutale les dendrites. Ce phénomène est réversible lorsque le NMDA est retiré du bain. La présence de ces vacuoles sur l'arborisation dendritique des souris SOD1 pourrait donc être une conséquence liée à un stress excitotoxique.

Ces études suggèrent une altération de l'excitabilité des circuits pré-moteurs, ce qui pourrait être à l'origine d'une hyperexcitation d'origine synaptique.

## 1.5 PLAN DE LA THESE

---

Sachant que les vacuoles observées sur l'arborisation dendritique des motoneurons SOD1 pourraient être la conséquence d'une excitotoxicité, il apparaît intéressant de caractériser ces vacuoles afin de mieux comprendre en quoi elles sont liées à une éventuelle excitotoxicité. Il est notamment intéressant d'étudier si les mitochondries et le RE sont impliqués, étant des réservoirs calciques et les premières victimes d'afflux massif de calcium. Enfin, partant du principe que leur formation est réversible en cas de disparition du stress, étudier leur évolution pourra nous indiquer comment évolue l'excitotoxicité.

**J'ai consacré la première partie de ma thèse à étudier et caractériser les vacuoles dendritiques observées dans nos marquages. Je détaille cette étude dans le premier chapitre de mes résultats (chapitre 3).**

Enfin, pour déterminer une éventuelle excitotoxicité, j'ai utilisé une préparation du laboratoire qui permet, de façon novatrice, de marquer toute l'arborisation dendritique d'un motoneurone. J'ai ainsi pu, par immunohistochimie, étudier la distribution synaptique sur les dendrites. Cette même technique permet également d'enregistrer *in vivo* chez l'adulte les réponses d'un motoneurone lors de la stimulation de circuits pré-moteurs. Cette méthode permet ainsi de réaliser des expériences de manière plus physiologique afin d'étudier l'implication des circuits et des interneurons dans la physiopathologie de la SLA.

**La deuxième partie de ma thèse a été d'étudier les projections pré-motrices, de manière anatomique et électrophysiologique, afin de**

**déterminer s'il y avait un changement de la balance excitation/inhibition des circuits projetant sur les motoneurones, à un stade pré-symptomatique, juste avant les premières dénervations des jonctions neuromusculaires (chapitre 4).**



## **2 MATERIEL ET METHODES**

---





Ce chapitre décrit les méthodes des expériences et analyses utilisées pendant ma thèse afin de répondre aux problématiques posées dans l'introduction.

## 2.1 ANIMAUX ET PREPARATION

---

Tous les animaux utilisés dans cette étude ont été élevés et hébergés dans l'animalerie de Paris Descartes. Toutes les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique de Paris Descartes, et elles suivent les Directives européennes (86/609/CEE et 2010-63-UE) et la législation française sur la protection des animaux utilisés pour des objectifs scientifiques. Pour cette étude, nous avons utilisé quatre lignées de souris :

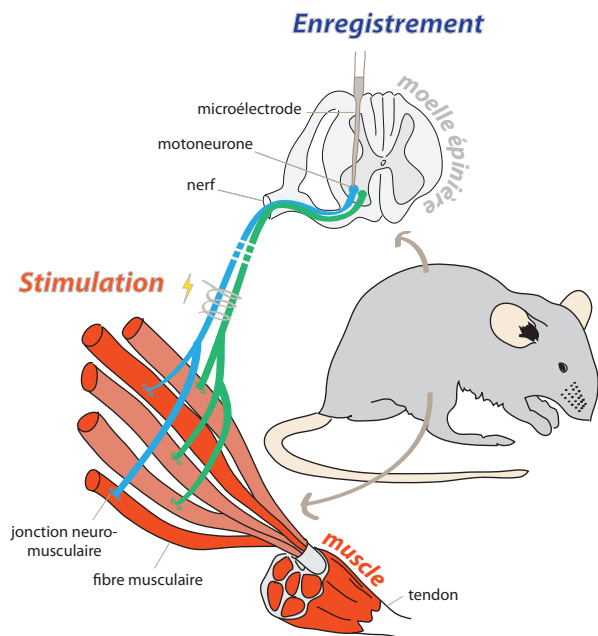
- B6SJL-Tg(SOD1<sup>G93A</sup>)1Gur/J, appelée SOD1, les mâles reproducteurs sont croisés avec les femelles B6SJL WT de Charles River. Ces souris transgéniques portent le gène humain SOD1 muté. C'est le modèle « high expressor line » de la mutation, celui qui contient de nombreuses copies du gène humain muté.

- B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J, appelée SODWT dont les mâles reproducteurs sont croisés avec des femelles B6SJL WT de Charles River. Ces souris portent le gène humain non muté.
- B6-tauON-hFUS<sup>P525L</sup>, appelée FUS, dont les mâles reproducteurs sont croisés avec des femelles B6 WT de Charles River. Ces souris portent le gène humain FUS muté.
- B6-tauON-hFUS, appelée FUSWT dont les mâles reproducteurs sont croisés avec des femelles B6 WT de Charles River. Ces souris portent le gène humain FUS non muté.

Nous avons utilisé comme contrôles des souris SOD1 les souris non transgéniques issues des mêmes portées (WT), et les souris SODWT. Pour la lignée FUS, nous avons utilisé comme contrôle la lignée FUSWT. Pour toute l'étude sur les varicosités et l'analyse anatomique des synapses, seules les femelles ont été utilisées. Pour l'étude des entrées synaptiques, nous avons utilisé mâles et femelles.

La procédure chirurgicale est adaptée de Manuel et al, 2009<sup>118</sup>. Dans un premier temps, la souris reçoit de l'atropine (0,20mg/kg ; Aguetant) et du methylprednisolone (0,05 mg ; Solu-Medrol, Pfizer), pour éviter respectivement la salivation et l'œdème. Dix minutes plus tard, l'anesthésie est induite par une injection i.p. de pentobarbitone sodium (70 mg/kg ; Pentobarbital, Sanofi-Aventis). La souris est mise sous respiration artificielle après une trachéotomie, avec de l'oxygène pur (ventilateur SAR-830/AP ; CWE). La pCO<sub>2</sub> est maintenue à 4% (MicroCapstar ; CWE). La fréquence cardiaque est monitorée (CT-100 ; CWE), et la température de la souris maintenue à 37°C grâce à une couverture chauffante et une lampe chauffante infrarouge. Un cathéter est introduit dans la jugulaire pour administrer l'anesthésique tout au long de l'expérience (usuellement toutes les 30 minutes) par intraveineuse (6mg/kg). La juste dose d'anesthésique est évaluée d'après l'absence de reflexes nociceptifs, la stabilité de la fréquence cardiaque (entre 400-500 bpm) et la pCO<sub>2</sub>. Une lente perfusion intraveineuse (50µL/h) d'une solution de glucose 4% contenant NaHCO<sub>3</sub> (1%) et gélatine (14% ; Plasmagel, Roger Bellon) aide à maintenir les paramètres

physiologiques. Le nerf sciatique est disséqué en continuité avec le muscle. Différentes branches du nerf sciatique ont été stimulées lors de l'étude : Triceps Surae, Sciatique Poplitée Interne, ou Péronier Commun. Enfin la moelle épinière est immobilisée par deux paires de barres horizontales (Cunningham Spinal



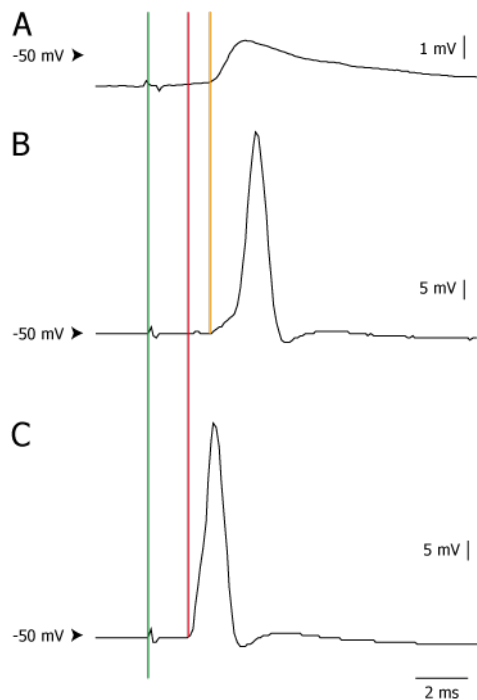
Adaptor ; Stoeling) appliquées sur les vertèbres Th12 et L2, et une laminectomie est réalisée entre les vertèbres Th13 et L1, pour mettre à jour les segments spinaux L3-L4 (Figure 11). Les tissus de la patte et de la moelle épinière sont immergés dans l'huile.

**Figure 11 : Schéma illustrant les deux ouvertures chirurgicales nécessaires au positionnement des deux électrodes (stimulation et enregistrement).**

## 2.2 ELECTROPHYSIOLOGIE

Les motoneurones sont empalés par une microélectrode de verre (diamètre 1-1,5  $\mu\text{m}$ , résistance 15-30  $\text{M}\Omega$  remplie d'une solution de KCL 3M + Neurobiotine 2% (Vector Laboratories) pour les marquages intracellulaires, K-Acétate 3M + 0,1M QX-314 (bloqueur des canaux sodiques, Sigma) pour les enregistrements de PPSE, et K-Acétate 2M pour les enregistrements de PPSI. Les enregistrements sont réalisés à l'aide d'un Axoclamp 2B amplifieur (Molecular Devices), relié à une interface Power401, géré par le logiciel Spike 2 (CED).

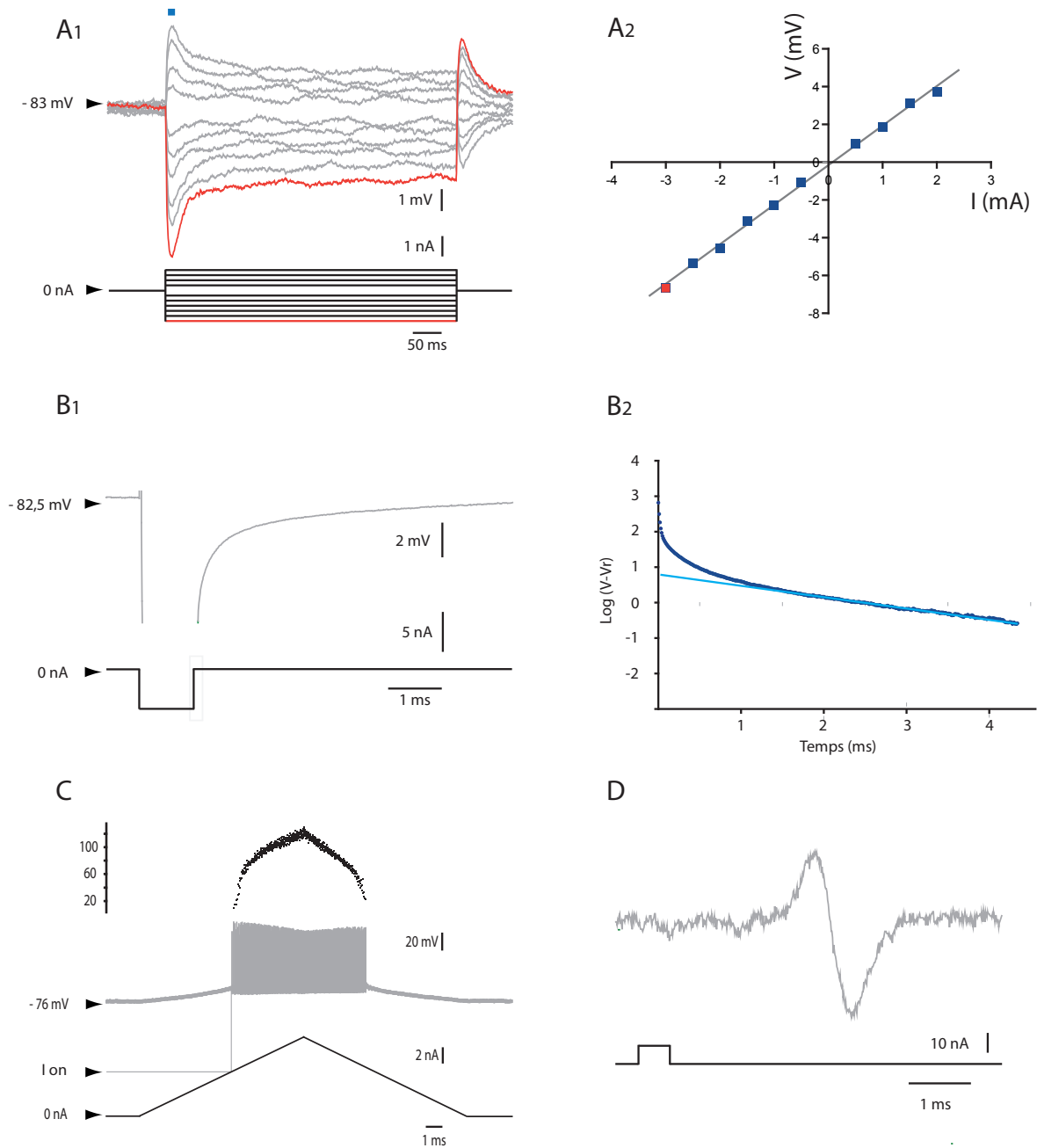
L'identification d'un motoneurone est assurée par l'enregistrement intracellulaire d'un potentiel d'action antidromique en réponse à la stimulation de son axone (Figure 12).



**Figure 12 : Caractérisation d'un motoneurone du triceps surae par l'émission d'un potentiel d'action (PA) antidromique.** **A** : Emission d'un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) monosynaptique suite à une stimulation du nerf du TS (ligne verte) de faible intensité. **B** : à une stimulation d'intensité plus élevée, émission d'un potentiel d'action (PA) lorsque le PPSE atteint le seuil de décharge. **C** : A une stimulation d'intensité encore plus forte, qui recrute l'axone moteur, émission d'un PA antidromique. Ce PA a une latence plus courte (ligne rouge) que celle du PA orthodromique (ligne jaune) reflétant l'absence du délai synaptique. La présence d'un PA antidromique permet donc d'identifier un MN comme étant du TS.

Seuls les motoneurones dont le potentiel de repos est inférieur ou égal à -50 mV et dont la pointe du potentiel d'action est plus dépolarisée que 0 mV sont conservés pour l'étude. Les propriétés électrophysiologiques sont mesurées en courant imposé continu, sauf pour la résistance et les rampes de courant où le mode est discontinu (DCC = 7-9 kHz).

Pour déterminer la résistance d'entrée, on injecte 5 séries de créneaux de courant hyperpolarisant et dépolarisant de faible intensité (Figure 13A<sub>1</sub>) et on enregistre la réponse en voltage du MN. On remarque que les réponses présentent un pic, suivi par un fléchissement aboutissant à un plateau. Le fléchissement correspond probablement à une activation (ou à une désactivation selon le sens du courant injecté) lente d'un courant I<sub>h</sub>. La résistance est mesurée en traçant la courbe voltage-courant correspondant aux valeurs « pics » du voltage et en effectuant une régression linéaire (Figure 13A<sub>2</sub>). La valeur de la résistance correspond à la pente de la droite de régression. Pour calculer la constante de temps membranaire, on induit un bref créneau de courant hyperpolarisant (Figure 13B<sub>1</sub>). La relaxation du voltage est une somme de fonctions exponentielles qui diffèrent par leurs constantes de temps. La constante de temps de l'exponentielle la plus lente est la constante de temps de la membrane. La Figure 13B<sub>2</sub> montre comment cette constante de temps est mesurée sur la portion linéaire du logarithme de la relaxation du voltage.



**Figure 13 : Propriétés sous-seuil des motoneurones de souris SOD1.** **A** : Estimation de la résistance d'entrée. A1 : Chaque tracé (en haut) est la moyenne de 5 enregistrements successifs en réponse à une série de créneaux de courant de 500 ms et d'amplitude allant de -3 à 2 nA (tracés du bas). La réponse en voltage atteint rapidement un pic (carré bleu) avant de se stabiliser à une valeur plateau plus basse. A2 : Mesure de la déflexion de voltage (valeurs au pic) selon l'intensité de créneau de courant. La ligne droite montre la régression linéaire dont la pente est la résistance d'entrée du MN. **B** : Mesure de la constante de temps membranaire (tracé du haut, la réponse pendant le créneau de courant est tronquée) suite à l'injection d'un créneau hyperpolarisant de courant (tracé du bas). B2 : représentation semi-logarithmique de la réponse en voltage (bleu foncé). La constante de temps membranaire est obtenue en mesurant la valeur absolue de la pente

(bleu clair) de la partie linéaire de la courbe. **C** : Mesure de la fréquence de décharge du MN en réponse à une lente rampe de courant. La ligne horizontale pointillée indique le courant pour lequel le MN commence à décharger (courant de recrutement,  $I_{0n}$ ). **D** : EMG de l'unité motrice (tracé du haut en vert) enregistré dans le TS après qu'un créneau de courant dépolarisant appliqué dans le MN (trace du bas) ait provoqué l'émission d'un PA.

Les propriétés de décharge des motoneurones sont étudiées au moyen de rampes triangulaires de courant de vitesse lente (0,05-2nA/s) et d'intensité maximale de 10 à 20 nA selon le seuil de recrutement des motoneurones (Figure 13C). Pour vérifier que le motoneurone forme encore des jonctions neuromusculaires fonctionnelles avec les fibres musculaires qu'il innerve, et que donc la dégénérescence n'a pas encore commencé, on enregistre, dans le muscle, l'EMG produit par l'excitation des fibres musculaires innervées par le motoneurone suite à la propagation du potentiel d'action du motoneurone jusqu'aux terminaisons de son axone (Figure 13D). Cet enregistrement peut se faire uniquement lorsque le nerf est disséqué en continuité avec le muscle.

Pour obtenir des PPSE monosynaptiques, le nerf du Triceps Surae est disséqué en continuité avec le muscle, et est placé sur une électrode de stimulation bipolaire en argent. Suite à la pénétration d'un motoneurone, la stimulation du nerf du Triceps Surae active les fibres Ia. L'enregistrement de l'activité des fibres afférentes activées par la stimulation du Triceps Surae est réalisé par une électrode de volée positionnée à la surface de la moelle épinière. En augmentant progressivement la stimulation, on détermine une valeur « seuil », pour laquelle on enregistre une réponse minimale de l'électrode de volée. Les intensités de stimulation décrites dans les résultats sont rapportées à cette valeur seuil. Le seuil est défini pour chaque motoneurone. Lors des stimulations appariées, le nerf est stimulé par des créneaux de courants séparés de 10 ms. Cette paire de stimulation est répétée 10 fois au minimum, à une fréquence de 3 Hz, pour moyenner chaque réponse. L'analyse est réalisée chaque fois à l'amplitude maximale du PPSE monosynaptique.

Pour l'analyse des PPSI, les nerfs du Sciatique Poplité Interne (SCI) et du Péronier Commun (CP) sont disséqués puis coupés du muscle, et les deux nerfs sont placés sur des électrodes de stimulation bipolaires en argent. La pénétration et l'identification d'un motoneurone du SCI sont réalisées grâce à la stimulation du nerf du SCI. Puis après identification, la stimulation du nerf du CP permet de stimuler différents circuits (afférences proprioceptives de muscles agonistes, afférences cutanées), qui projettent sur le motoneurone du SCI. Le seuil est déterminé par la stimulation croissante du nerf du CP et l'enregistrement de la volée, de la même façon que lors de l'enregistrement des PPSE. Les PPSE et PPSI sont enregistrés en courant imposé.

A la fin des expériences, les animaux sont euthanasiés par une injection intraveineuse létale de pentobarbital.

## **2.3 MARQUAGES INTRACELLULAIRES**

---

Pour marquer intracellulairement un motoneurone, le nerf du Triceps Surae est disséqué en continuité avec le muscle. Après identification d'un motoneurone du Triceps Surae, l'efficacité de la jonction neuromusculaire est vérifiée pour les souris à P50, puis les propriétés du motoneurone sont enregistrées. A P90, malgré la rétractation des jonctions neuromusculaires des motoneurons FF, il est toujours possible de stimuler leurs axones, et donc de pénétrer et d'identifier un motoneurone FF. La microélectrode remplie de KCl 3M + Neurobiotine 2% (Vector Laboratories) est utilisée pour appliquer un train de créneaux de courants dépolarisants au motoneurone (2-5 nA pendant 500ms, répétés à 1 Hz pendant une durée totale de 10 minutes), pour permettre de transférer par iontophorèse la molécule chargée dans le milieu intracellulaire. 45 minutes après le retrait de l'électrode, temps nécessaire à la diffusion de la neurobiotine jusque dans les



parties distales des dendrites, la souris est perfusée en intracardiaque avec 50mL de PBS puis 100mL de paraformaldéhyde et la moelle épinière exposée est prélevée.

## 2.4 MARQUAGES RETROGRADES

---

Pour étudier le nombre de synapses autour des somas, nous avons réalisé des marquages rétrogrades. En effet ces expériences permettent de marquer plusieurs motoneurones par souris, et ainsi d'augmenter le nombre de somas étudiés, alors que le marquage intracellulaire ne marque qu'un seul soma par souris. En revanche, le marquage rétrograde ne marque que le soma, pas les dendrites. Pour cela, 2 souris SOD1<sup>G93A</sup> et 2 souris WT ont été utilisées. Les souris âgées de 40 jours sont endormies sous isofluorane. Après une incision de la peau de la patte arrière droite (le même côté que lors des chirurgies), la cholératoxine B (CTb, environ 2µL) est injectée grâce à une microélectrode de verre dans le Gastrocnémien latéral (un des trois muscles du Triceps Surae). La peau est refermée avec de la colle chirurgicale. Les souris sont ensuite surveillées et reçoivent un traitement antidouleurs pendant 3 jours. Après 10 jours, pour laisser le temps au CTb d'être transporté jusqu'aux somas des motoneurones, les souris sont perfusées avec 50mL de PBS puis 100mL de PFA. Une laminectomie est réalisée entre Th13 et L1, pour prélever la moelle sur les segments L3-L4 (segments où sont situés les motoneurones du Triceps Surae).

## 2.5 IMMUNOHISTOCHEMIE

---

Après perfusion de la souris, la moelle épinière est prélevée et piégée dans un bloc d'Agarose (4%), puis sectionnée transversalement en coupes de 50 µm d'épaisseur avec un vibratome (VT1000S, Leica GmbH, Wetzlar, Allemagne). Les tranches sont incubées pendant 1h dans une solution de PBS(1X)-Triton(3%)-BSA(5mg/mL)-Sérum d'âne(10%). Les coupes sont rincées 3x10min au PBS, puis la neurobiotine est révélée par incubation des tranches pendant 2h dans une solution de PBS-Triton(1%)-BSA(5mg/mL) avec le complexe Streptavidin-CY3 (1/500, Sigma-Aldrich). Les tranches sont de nouveau rincées 3x10min au PBS, puis incubent à 4°C pendant la nuit dans une solution de PBS-Triton(1%)-BSA(5mg/mL) avec les anticorps primaires : lapin anti-VGAT (*Vesicular GABA Transporter* - Synaptic System - 1/500), cochon d'inde anti-VGLUT1 (*Vesicular glutamate transporter 1* - Merck Millipore - 1/4000), cochon d'inde anti-VGLUT2 (Merck Millipore- 1/500), souris anti-GluR2 (Merck Millipore - 1/200), chèvre anti-ChaT (Millipore - 1/500), lapin anti-MAP LC3 (Santa Cruz - 1/50), mouton anti-Cytochrome C (Sigma - 1/800), lapin anti-COXIV (abcam - 1/500), lapin anti-VDAC (abcam - 1/100), lapin anti-p62 (abcam - 1/200), lapin anti-TIM (abcam - 1/100), souris anti-TOMM22 (abcam - 1/50), lapin anti-CalR (abcam - 1/200), souris anti-MFN2 (abcam - 1/800), lapin anti-SK3 (Millipore - 1/500).

Après rinçage pendant 3x10min au PBS, les coupes sont incubées pendant 3h à température ambiante dans une solution de PBS-Triton(1%)-BSA(5mg/mL) et d'anticorps secondaires d'âne anti-lapin couplé à l'Alexa 488 (Jackson Immunoresearch Laboratories - 1/500), âne anti-cochon d'inde couplé à l'Alexa 647 (Jackson Immunoresearch Laboratories - 1/500), âne anti-souris couplé à l'Alexa 405 (Jackson Immunoresearch Laboratories - 1/500), âne anti-chèvre couplé au Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories - 1/500), âne anti-mouton couplé à l'Alexa 488 (Thermo Fischer - 1/800), âne anti-lapin couplé à l'Alexa 647 (Thermo Fischer - 1/800), âne anti-lapin couplé à l'Alexa 405 (Jackson

ImmunoResearch Laboratories - 1/500), âne anti-souris couplé à l'Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories - 1/500). Les coupes sont rincées 3x10min au PBS puis montées entre lames et lamelles avec du fluoroshield (Sigma-Aldrich). L'acquisition des piles d'images est réalisée sur les tranches sériées avec un microscope confocal (LSM710; Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

## 2.6 IMMUNOEMPREINTE (*WESTERN BLOT*)

---

Quatorze souris ont été utilisées pour des quantifications par immunoempreinte. Huit souris SOD1 (2 P12, P50, P70, 4 P90) et six souris contrôles non transgéniques (2 P12, P50, 3 P90), de même portée que les souris SOD1. Les souris sont brièvement endormies sous isofluorane puis décapitées. Une laminectomie est réalisée entre Th13 et L1. Les moelles sont prélevées fraîches, entre les segments L3 et L4. Puis une hémisection est réalisée dans le plan horizontal, afin de ne conserver que la partie ventrale de la moelle où se situent les motoneurones.

### 2.6.1 LYSÉ CELLULAIRE ET DOSAGE DE PROTÉINES

Après 2 lavages dans du PBS 1X, la moelle est lysée dans un tampon contenant du Tris-HCL (0.05 M), du NaCl (0.15 M), et un cocktail d'anti-phosphatase (1X) et d'anti-protéase (1X) et 1% de détergent NP40 pendant 30 minutes à 4 °C. A la fin du temps d'incubation, une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes est réalisée. Le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré et désigné comme fraction soluble.

La concentration protéique totale des lysats cellulaires est préalablement estimée par un dosage de protéines, en utilisant le kit microBCA Protein Assay

(Pierce). L'absorbance mesurée à 562 nm est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans la solution, et elle est estimée par comparaison avec une protéine standard, dans notre cas l'albumine de sérum bovin (BSA). Les absorbances sont déterminées à l'aide d'un lecteur de plaque (Multiscan Ex. Thermo Electron corporation).

## 2.6.2 IMMUNOEMPREINTE

Le niveau d'expression des protéines est analysé dans les différentes conditions expérimentales, 20 µg de chaque échantillon est déposé sur un gel de polyacrylamide à gradient 4-12 % (NuPAGE® Novex® Bis-Tris Protein Gels). Les protéines sont dénaturées dans un premier temps par l'addition d'un tampon LDS (1X) et d'un agent réducteur (1X). Les échantillons sont mis à 70°C pendant 10 minutes, puis déposés sur le gel et soumis à la migration dans le tampon NuPage MES. Après 35 minutes de migration à 200 V, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à un système de transfert semi-sec (Thermo scientific OWL) à ampérage fixe de 0,25 A/membrane pendant 1 heure et 30 minutes. À la fin du transfert, les membranes sont colorées avec du rouge ponceau, pour vérifier le transfert des protéines, puis saturées pendant 1 heure à température ambiante avec une solution de TBS 1X-tween 1%-lait 5%. Elles sont ensuite incubées pendant 1 nuit à 4 °C avec les anticorps primaires correspondants : anti-p62 (Lapin, Cell Signaling), anti-LC3 (Lapin, MBL), anti-Beclin (Lapin, BD), anti-Atg5 (Lapin, Novus), anti-actine (Souris, Millipore), anti-MFN2 (Souris, Sigma), anti-OPA1 (Souris, BD- Pharmigen), anti-DRP1 (Souris, BD- Pharmigen), anti-Parkin (Souris, Millipore), et anti-VDAC (Souris, Thermo Fisher). A la fin de l'incubation, les membranes sont lavées 3 fois avec du TBS 1X-tween 0,1 %, puis elles sont incubées avec l'anticorps secondaire approprié à l'anticorps primaire (anti-souris ou anti-lapin) couplé à la HRP (horseradish peroxidase) pendant 1 heure à température ambiante. Les membranes sont lavées 3 fois avec du TBS 1X-tween 0,1 %, puis les membranes sont révélées par un substrat rendu lumineux par la HRP (Bierce® ECL 2 Western Blotting substrate, Thermo Scientific).

La révélation des bandes est réalisée à l'aide de la caméra G-BOX, (Syngene). La quantification du signal émis par les bandes est réalisée à l'aide du logiciel « GeneSnap » (Syngene). Et dans le but de corriger les erreurs, les niveaux d'expression des protéines sont normalisés par rapport à l'actine.

## 2.7 ANALYSES

---

### 2.7.1 COMPTAGE DES MITOCHONDRIES ET DES VACUOLES D'AUTOPHAGIE

Les images sont binarisées et seuillées. Pour compter le nombre de vacuoles d'autophagie dans le soma, j'ai compté toutes les vacuoles d'un plan, puis divisé ce nombre par l'aire du soma mesurée sur ImageJ. Dans les dendrites, les mitochondries et les vacuoles d'autophagie sont comptées manuellement en trois dimensions sur toute la pile d'images. Un organe est comptabilisé s'il y a colocalisation de tout l'organe avec la dendrite. La densité est calculée en divisant le nombre par l'aire de la varicosité.

### 2.7.2 QUANTIFICATION DES MAM

Les acquisitions des piles d'images des moelles marquées à la CalR et MFN2 sont réalisées avec les mêmes paramètres du confocal. La quantification de la colocalisation entre la calréticuline (CalR) et MFN2 est réalisée grâce à l'analyse « Coloc 2 » de ImageJ. Cette analyse donne le coefficient de Pearson, qui représente le degré de colocalisation. Ce coefficient est compris entre -1 et 1 : à 1, la colocalisation est parfaite, à -1, c'est l'anticolocalisation, c'est-à-dire qu'aucun pixel ne colocalise, et tous les pixels non marqués par un canal sont marqués par l'autre canal. Pour vérifier que cette analyse est juste et que le coefficient de Pearson est significatif, j'ai utilisé l'analyse de Costes, qui compare le coefficient

de Pearson à une même analyse dont les pixels des deux canaux sont répartis de manière aléatoire. Ainsi plus la corrélation  $r$  de l'analyse de Costes est proche de 1, plus l'analyse est significative. Je n'ai conservé dans cette étude que les coefficients de Pearson dont l'analyse de Costes donne  $r=1$ .

### 2.7.3 COMPTAGES DES SYNAPSES

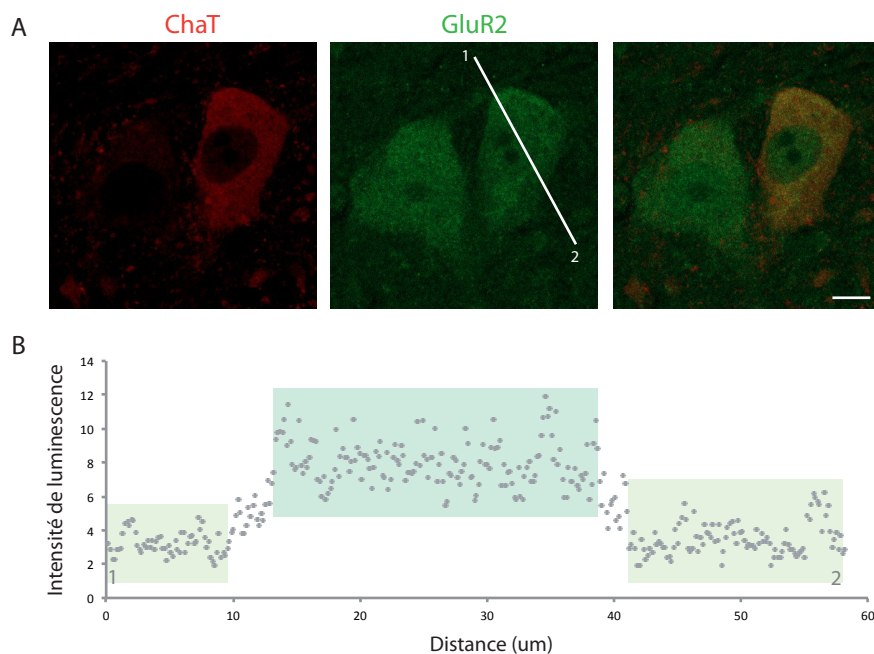
Pour l'analyse des synapses, les images sont seuillées et binarisées avec un module permettant de normaliser les fluorescences et le rapport signal/bruit pour toutes les images.

La densité des contacts sur le motoneurone est analysée par le logiciel ImageJ et à l'aide de Neurolucida. Pour l'analyse du soma, le nombre de contacts étant très importants autour du soma, les contacts apparaissent fusionnés. La quantification de ces contacts a donc été faite par analyse du périmètre de recouvrement du soma par les contacts. Ceci a été fait sur plusieurs plans optiques d'un même pile d'images, par mesure des longueurs d'apposition de la fluorescence des contacts inhibiteurs et excitateurs, puis mesure du périmètre du soma pour calculer le pourcentage de recouvrement. Les mesures sur les différents plans optiques du soma sont moyennées pour obtenir une donnée par motoneurone. Pour augmenter le nombre de motoneurones étudiés, les motoneurones injectés à la neurobiotine et les motoneurones marqués au CTb (marquage intramusculaire) sont utilisés.

Sur les dendrites, les boutons sont comptés manuellement en trois dimensions sur toute la pile d'images. On considère qu'il y a apposition étroite, et donc très probablement contact synaptique, lorsque les boutons sont colocalisés ou en contact (pas de pixel non coloré entre les deux canaux) avec le motoneurone. Les portions de dendrite analysées sont ensuite reconstruites sur Neurolucida afin d'obtenir la longueur du segment considéré, et ainsi déduire la densité synaptique sur chaque portion de dendrite. Les varicosités dendritiques sont également mesurées (longueur, diamètre), sur ImageJ.

## 2.7.4 QUANTIFICATION DE LA LUMINESCENCE DU MARQUAGE GLUR2

Pour quantifier le nombre de sous-unités GluR2 des récepteurs AMPA dans le motoneurone, j'ai utilisé une souris contrôle et une souris SOD1 à P50. Nous avons choisi cet âge car le but est d'expliquer les analyses électro physiologiques, réalisées à P50. Les acquisitions d'images sont réalisées avec les mêmes paramètres au confocal. Les motoneurones sont identifiés par le marquage ChaT (Figure 14A). Pour évaluer la différence de quantité de GluR2 entre les souris, une droite est tracée croisant le motoneurone. L'intensité de fluorescence est mesurée dans et hors du motoneurone par un graphe représentant l'intensité lumineuse de tous les pixels de la droite (Figure 14B). Le rapport de l'intensité dans le motoneurone sur l'intensité en dehors du motoneurone donne le rapport signal/bruit.



**Figure 14 : Quantification de la luminescence du marquage GluR2. A :** Sélection des motoneurones marqués par ChaT. **B :** Traçage du profil des valeurs de luminescence d'une droite qui coupe le motoneurone. Chaque point représente la luminescence d'un pixel que la droite coupe dans le motoneurone. On moyenne l'intensité de chaque pixel en dehors du motoneurone

(points du graphe situés dans les boîtes vertes) et dans le motoneurone (points du graphe situés dans la boîte bleue)

## 2.8 STATISTIQUES

---

Quand les échantillons dépassent 30 valeurs, j'ai réalisé des tests de normalité avec le test de Shapiro et Wilk, pour savoir si ils suivent une loi normale. Lorsque les distributions suivent une loi normale, j'ai réalisé sur ces échantillons des tests de Student. Dans les cas contraire, ou lorsque les échantillons sont inférieurs à 30 valeurs, les statistiques ont été réalisées avec le test de Wilcoxon et Mann-Whitney (MW), car les échantillons ne sont pas appariés.





### **3 VACUOLISATION DES VARICOSITES SUR LES DENDRITES DE MOTONEURONES SOD1**

---



## 3.1 INTRODUCTION

---

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'équipe travaillait sur l'analyse anatomique de l'arborisation dendritique. Cette analyse devait déterminer si la baisse de résistance observée dans les motoneurones SOD1 s'expliquait par une différence anatomique des dendrites. C'est lors de cette étude que Nicolas Delestrée a observé l'existence de vacuoles dans les dendrites de souris SOD1. Nous nous sommes alors posés de nombreuses questions quant à ces vacuoles : est-ce un phénomène physiologique que l'on retrouve dans des souris contrôles ? Par quel mécanisme se forment-elles ? Ont-elles un lien avec un changement d'excitation reçu par le motoneurone ? Pour y répondre, nous avons cherché à caractériser ces vacuoles de manière anatomique et comprendre leur origine par des marquages d'immunohistochimie.

## 3.2 CARACTERISATION DES VACUOLES DE VARICOSITES

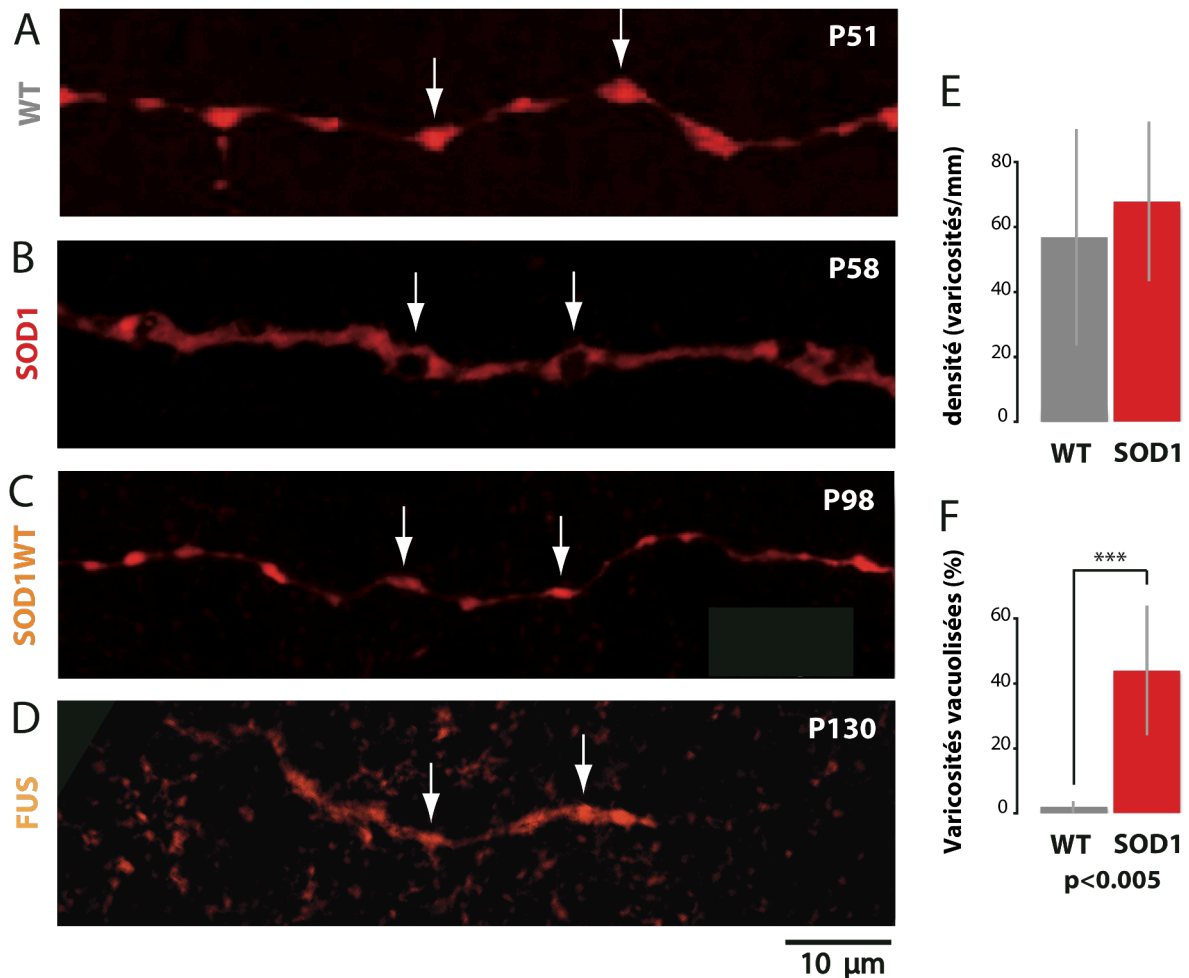
---

### 3.2.1 LA VACUOLISATION EST DUE A LA MUTATION SOD1

Pour étudier les vacuoles des motoneurones, nous avons utilisé 68 souris SJL dont 36 souris SOD1 (âge 12 à 110 jours), 6 souris SODWT (âge 70 à 180 jours), 24 souris non transgéniques (âge 50 à 180 jours). Nous avons également utilisé 12 souris B6SJL dont 6 souris ayant la mutation FUS (P40 à P130), et 6 souris ayant le transgène humain non muté, noté FUSWT (âge 60 à 90 jours). Pour chaque souris, nous avons marqué un neurone par injection intracellulaire de neurobiotine. Après perfusion, la neurobiotine est révélée par immunohistochimie grâce au complexe Streptavidin-CY3.

En étudiant les dendrites des motoneurones de souris contrôles, nous avons remarqué qu'elles forment des grossissements par endroit (Figure 15A et B). Pour quantifier la densité de ces grossissements, nous avons utilisé 6 souris SOD1 et 6 souris WT. Pour chaque souris, nous avons compté le nombre de grossissements sur une longueur cumulée de dendrites de 1cm en moyenne. Nous avons ainsi obtenu une densité pour chaque neurone, que nous avons moyennée. Ces grossissements se retrouvent dans la même densité sur les dendrites de souris WT et SOD1 (Figure 15E) (WT :  $67,3 \pm 27,7$  varicosités/ $\mu\text{m}$ ,  $n=6$  ; SOD1 :  $65,1 \pm 21,4$  varicosités/ $\mu\text{m}$ ,  $n=6$  ; MW,  $p\text{-value}=0,81$ ). Nous les avons appelé **varicosités**. De manière intéressante, en étudiant plus spécifiquement les varicosités des motoneurones SOD1, nous avons remarqué qu'une zone noire se trouvait à l'intérieur, zone où la neurobiotine est donc absente (Figure 15B). La neurobiotine ne traversant pas les membranes, cette zone noire correspond à une zone délimitée par une membrane. Nous l'avons appelée **vacuole**. Les vacuoles se retrouvent de manière épisodique dans les motoneurones contrôles, alors qu'elles sont abondantes dans les motoneurones

de souris SOD1. (Figure 15F, WT :  $2,4 \pm 2,3\%$ ,  $n=6$  ; SOD1 :  $44 \pm 20\%$ ,  $n=6$  ; MW,  $p\text{-value}=0,0048$ ).



**Figure 15 : Les varicosités se vacuolisent dans les motoneurones SOD1.** **A.** Varicosités d'un motoneurone WT. **B.** Vacuolisation d'un motoneurone SOD1. **C.** Varicosités d'un motoneurone SOD1WT. **D.** Varicosités d'un motoneurone FUS. L'absence de vacuoles en C et D montre que la vacuolisation se fait uniquement par la mutation SOD1. **E.** La densité des varicosités et des vacuoles est la même, montrant que dans les motoneurones SOD1, ce sont les varicosités qui se vacuolisent. **F.** Pourcentage de varicosités vacuolisées chez les motoneurones WT et SOD1.

Cependant, les souris SOD1 étant transgéniques, et portant un nombre élevé de copies du transgène SOD1 muté, nous nous sommes demandé si les varicosités pouvaient venir du transgène et de son nombre de copies, plutôt que de la mutation. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé des souris

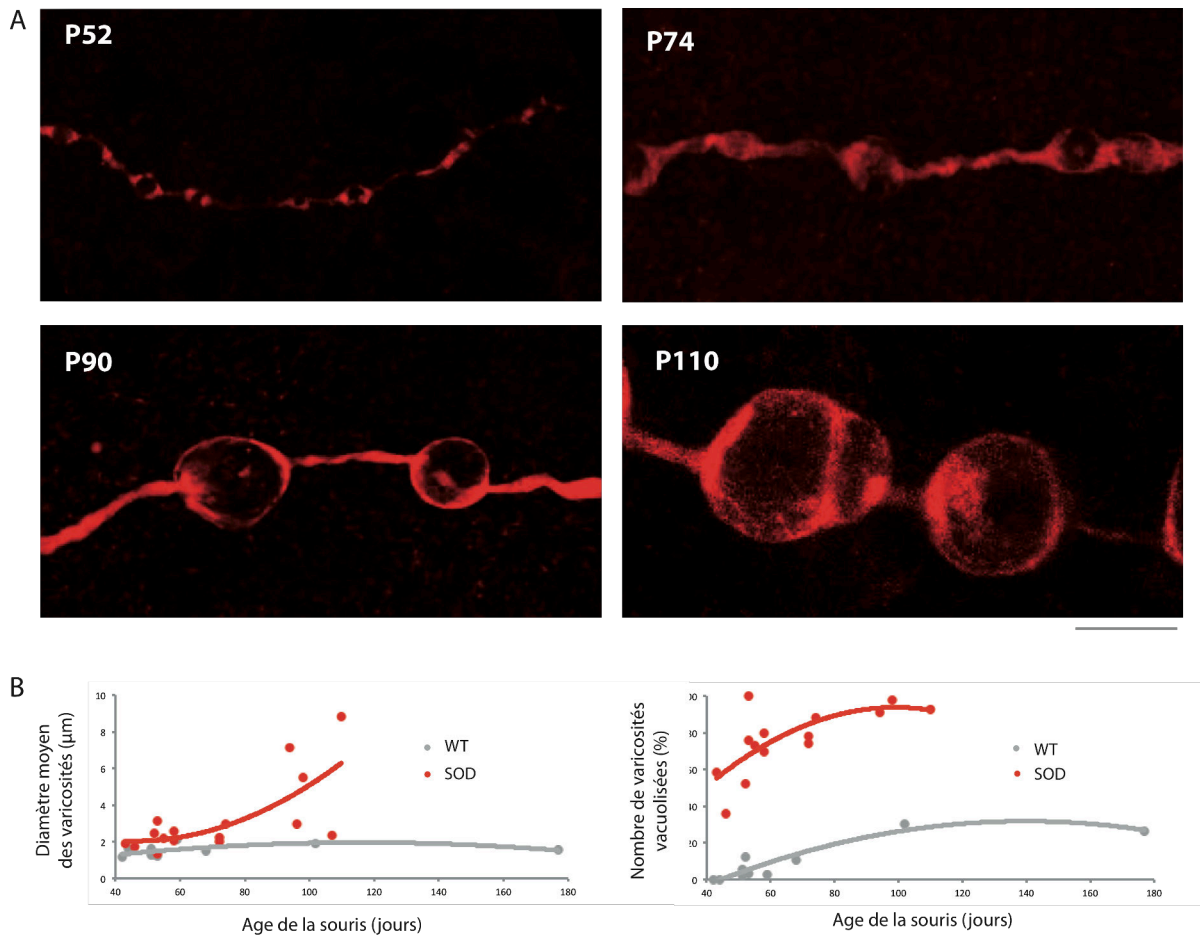
transgéniques portant un nombre élevé de copies d'un transgène humain SOD1 non muté. La lignée transgénique est appelée SOD1WT. L'injection de neurobiotine dans un motoneurone SOD1WT ne montre pas de vacuoles dans les varicosités dendritiques (Figure 15C), et cela, même à un âge plus avancé, P98 sur la figure. La formation de vacuoles dans les varicosités dendritiques est donc une conséquence de la mutation du gène SOD1.

Enfin, la Sclérose Latérale Amyotrophique pouvant être causée par de multiples mutations différentes, nous avons alors voulu vérifier si d'autres mutations que celles portant sur le gène SOD1 formaient également des vacuoles. Nous avons utilisé des souris FUS, dont le gène humain FUS muté a été ajouté par transgénèse à des souris B6<sup>140</sup>, c'est la lignée tauON-hFUS-P525L. Cette mutation est particulièrement intéressante à étudier puisqu'elle touche une protéine dont le mode d'action est complètement différent de SOD1. En effet, FUS est impliqué dans la régulation de la transcription des RNA, l'épissage, le transport et la traduction<sup>141</sup>. L'évolution de la maladie chez ces souris est différente. Elles ne meurent pas de la maladie, et la paralysie est lente et progressive. Tous les muscles ne perdent pas leur force au même moment. La dénervation des jonctions neuro-musculaires du Triceps Sural, muscle étudié ici, commence autour de P80<sup>140</sup>. J'ai donc marqué un motoneurone du TS à cet âge dans les souris FUS, mais les varicosités ne présentent pas de vacuoles. Pour être sûre que les vacuoles n'apparaissent pas plus tardivement, j'ai marqué un motoneurone de souris FUS à P130 (Figure 15D), âge où 15% des jonctions neuromusculaires du Gastrocnemius Lateral sont déjà dénervées<sup>140</sup>. A cet âge, le motoneurone FUS ne montre pas non plus de varicosités vacuolisées. L'apparition de vacuoles n'est donc pas un caractère physiopathologique général de la maladie.

### **3.2.2 LES VACUOLES GROSSISSENT AVEC L'ÂGE ET FUSIONNENT**

A P50, les varicosités des motoneurons SOD1 n'ont pas un diamètre significativement plus large que les varicosités des motoneurons contrôles (WT :

0,76±0,27 µm, n=6 ; SOD1 : 1,31±0,54 µm, n=6 ; MW, p-value=0,09), mais leur longueur est augmentée (WT : 1,49±0,63 µm, n=6 ; SOD1 : 3,74±0,87 µm, n=6 ; MW, p-value=0,002). Ceci est du à la vacuolisation des varicosités des motoneurones de souris SOD1.



**Figure 16 : Les vacuoles grossissent avec l'âge de la souris. A :** Taille croissante des vacuoles entre P50 et P110. **B :** Courbes représentant l'évolution avec l'âge du diamètre moyen des varicosités, et du pourcentage de varicosités vacuolisées.

Nous nous sommes demandé dans quelle mesure ces varicosités grossissaient avec l'évolution de la maladie. J'ai donc réalisé un marquage intracellulaire de 16 motoneurones de souris SOD1 et 10 motoneurones de souris WT entre P50 et P110, stade terminal de la maladie, et mesuré les diamètres des varicosités. Comme le montre la Figure 16, les varicosités ont toujours une forme



ronde. Cependant elles grossissent considérablement pour atteindre des diamètres de 15  $\mu\text{m}$ , soit une taille dix fois supérieure à leur taille à P50.

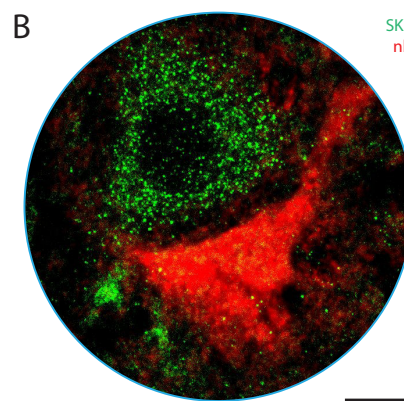
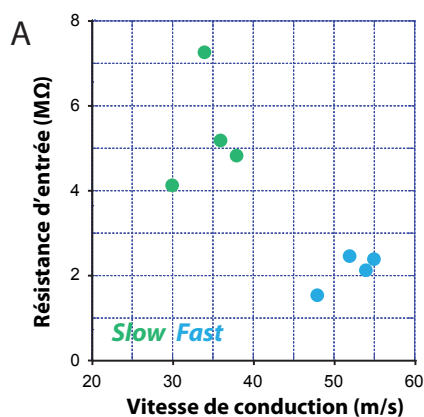
Pour visualiser cette évolution, j'ai représenté sur un graphe le diamètre moyen des varicosités de chaque motoneurone étudié selon l'âge de la souris. Pour obtenir une courbe moyenne, j'ai tracé la courbe polynomiale d'ordre 2 issue de ces valeurs. La courbe de la Figure 16B illustre ainsi l'augmentation de la taille des varicosités chez les souris SOD1. En comparaison, la taille des varicosités n'évolue pas avec le temps chez les souris contrôles. Ainsi la mutation SOD1 provoque la formation et le grossissement de vacuoles dans les varicosités.

Nous avons vu que les varicosités se vacuolisent dans les motoneurones SOD1. Nous nous sommes demandé si cette proportion de varicosités vacuolisées augmentait avec la maladie. Nous avons donc comptabilisé le nombre de varicosités vacuolisées dans les motoneurones (Figure 16B). Le nombre de varicosités vacuolisées augmente rapidement dans les motoneurones SOD1, pour atteindre 100% à P90. Mais ce nombre augmente également dans les motoneurones WT, pour atteindre 30% dès P102 et se stabiliser ensuite. La manifestation de vacuoles dans les varicosités est donc un phénomène normal dans de faibles proportions et sur des souris WT âgées. C'est donc un signe pathologique lié au vieillissement des souris. Mais, chez les souris mutantes, les vacuoles observées à P50 sont donc un phénomène pathologique lié à la mutation SOD1.

### **3.2.3 LES VACUOLES GROSSISSENT DIFFEREMMENT SELON LE TYPE PHYSIOLOGIQUE DU MOTONEURONE**

Les motoneurones sont touchés différemment par la maladie. En effet, nous avons vu que les motoneurones de type *Slow* sont plus résistants à la maladie, tandis que les motoneurones de type *Fast* dégénèrent les premiers. Pour évaluer le lien entre ces vacuoles et la dégénérescence des motoneurones, nous avons étudié l'évolution de la taille des varicosités avec l'âge, selon le type physiologique des motoneurones étudiés.

Pour réaliser cette étude, nous avons marqué plusieurs motoneurones à la neurobiotine selon la méthode définie plus haut, et déterminé leur type physiologique. Nous avons ainsi formé deux groupes. Le premier groupe de motoneurones avait une vitesse de conduction axonale de 45m/s et une résistance d'entrée inférieure à 2,5M $\Omega$ . Ces caractéristiques sont similaires à celles de motoneurones *Fast*. Le deuxième groupe avait une vitesse de conduction axonale inférieure à 40m/s et une résistance d'entrée supérieure à 4M $\Omega$ . Ces caractéristiques se rapprochent de celles de motoneurones *Slow*. La ségrégation a été confirmée par des marquages immunohistochimiques des motoneurones *Slow* avec l'anticorps SK3, protéine spécifique de ces motoneurones (Figure 17). Pour étudier l'évolution du diamètre des varicosités, nous avons étudié des motoneurones à P50, P70, P90 et P110. Nous avons obtenu ainsi quatre paires de motoneurones.



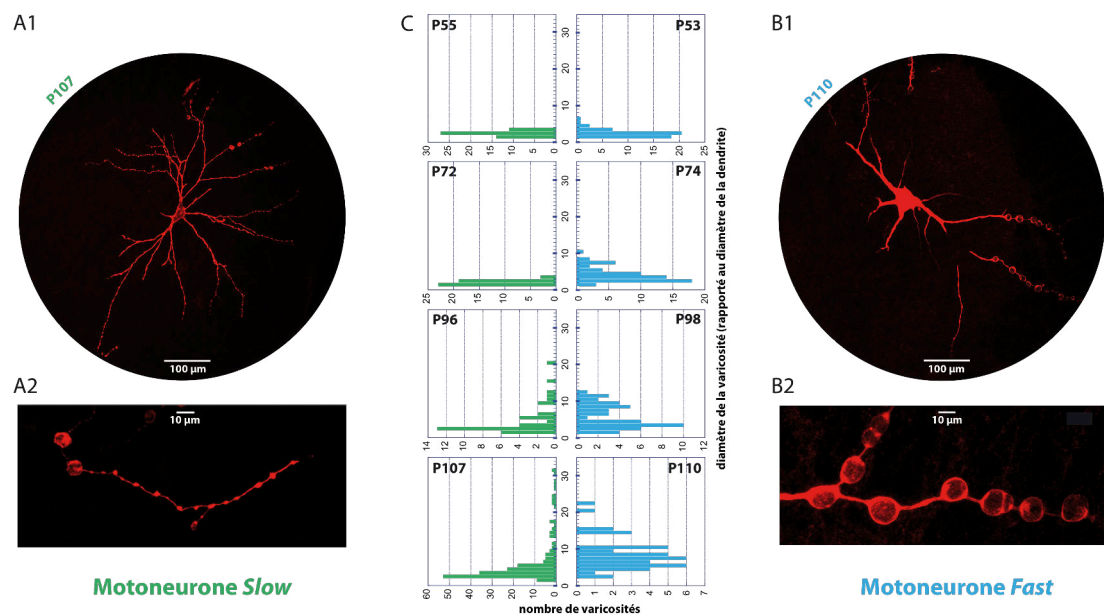
**Figure 17 : Identification des motoneurones *Fast* et *Slow*.**

**A :** Etude de la résistance d'entrée et de la vitesse de conduction. **B :** Vérification des propriétés physiologiques de motoneurones par le

marquage SK3. Dans ce cas, le motoneurone marqué à la neurobiotine (rouge) n'est pas marqué par SK3 (vert), contrairement au neurone voisin. C'est un motoneurone *Fast*. Barre = 10  $\mu$ m

Comme nous le supposions, d'après la Figure 18, le diamètre des varicosités chez les motoneurones *Fast* et les motoneurones *Slow* évolue différemment. La Figure 18A illustre les dendrites d'un motoneurone *Slow* à P110, dont seules quelques varicosités dépassent 10  $\mu$ m de diamètre. La Figure 18B montre les dendrites d'un motoneurone *Fast* au même âge. Toutes les varicosités font au moins 10  $\mu$ m de diamètre. La Figure 18C donne les histogrammes des diamètres des varicosités en fonction de l'âge des motoneurones *Fast* et *Slow*. La

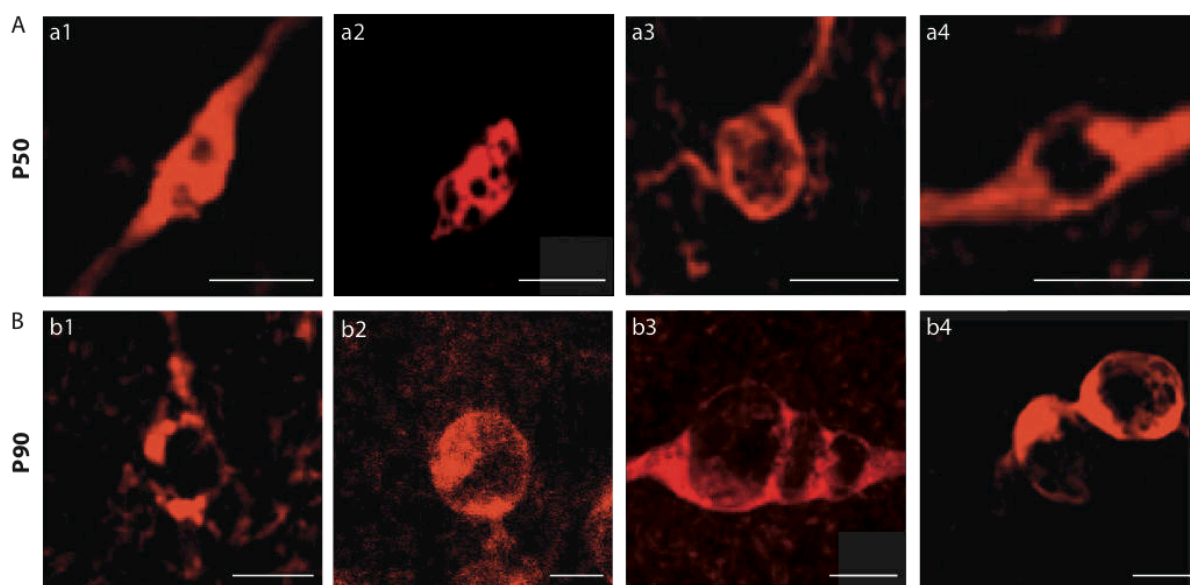
distribution des diamètres des varicosités montre qu'à âge équivalent, les varicosités de gros diamètres sont plus nombreuses dans les motoneurones *Fast* que dans les *Slow*. Ce résultat suggère que les varicosités y grossissent plus rapidement.



**Figure 18 : Les vacuoles grossissent plus vite dans les motoneurones *Fast* que dans les motoneurones *Slow*.** **A1** : Acquisition au confocal de la tranche de 50μm sur laquelle se situe le soma du motoneurone *Slow* et des dendrites sur le même plan, à P107. **A2** : Zoom sur une portion de dendrite de motoneurone *Slow*. **B1** : Acquisition au confocal de la tranche de 50μm sur laquelle se situe le soma du motoneurone *Fast* et des dendrites sur le même plan, à P110. **B2** : Zoom sur une portion de dendrite de motoneurone *Fast*. **C** : Histogrammes des diamètres des varicosités de P50 à P110 pour les quatre couples de motoneurones *Slow* et *Fast*.

Les vacuoles sont donc une forme lente de dégénérescence des dendrites, qui commence dès P50. La taille des varicosités est corrélée à la dégénérescence des motoneurones. La présence de très grosses varicosités est un signe de mort imminente du motoneurone. En effet, les motoneurones *Fast* à P110 sont en fin de vie<sup>33,34</sup>. Mais comment ces varicosités peuvent-elles atteindre une telle taille ? De plus, ces vacuoles demandent un important apport de membrane, d'où vient-elle ? Pour répondre à ces questions, j'ai étudié l'origine des vacuoles.

### 3.2.4 LES VARICOSITES ACCUMULENT LES VACUOLES



**Figure 19 : Les varicosités contiennent plusieurs vacuoles qui s'agglomèrent.** **A** : Exemples de structures observées dans les varicosités de motoneurones de souris SOD1 à P50. **B** : A P90, les structures ne sont plus dissociées par la neurobiotine. A mesure que la varicosité augmente de taille, les vacuoles s'agglomèrent. Barre = 5  $\mu$ m

Pour comprendre l'origine de la vacuole, j'ai commencé par observer sa structure et son évolution dans le temps. En effet, j'ai remarqué que certaines varicosités contenaient plusieurs vacuoles, et ce dès P50 (Figure 19a<sub>1</sub> et a<sub>2</sub>). Sur d'autres photos, les vacuoles n'avaient pas un pourtour régulier (Figure 19a<sub>3</sub> et a<sub>4</sub>), malgré une forme ronde de la varicosité. A P90, le contour irrégulier se retrouve dans une varicosité plus grosse (Figure 19B). La « zone noire » est également plus grosse. Ces photos nous laissent penser que les varicosités sont en réalité constituées de nombreuses vacuoles. A mesure que la maladie avance, les vacuoles se font plus nombreuses, s'agglutinent et se collent, empêchant la neurobiotine de circuler entre elles. On obtient alors des grosses structures délimitées par le contour de toutes les vacuoles qu'elles contiennent. C'est donc l'ensemble des vacuoles qui constitue la **zone noire**. Dans certains cas, on observe des varicosités contenant 2 ou 3 grosses vacuoles accolées. Ces photos

nous orientent vers une possibilité de fusion des vacuoles entre elles : elles forment ainsi des grosses bulles au contour arrondi. Les fusions entre vacuoles expliqueraient d'une part la diminution du nombre de varicosités avec l'avancée de la maladie. A mesure que les varicosités augmentent de taille, elles englobent leurs voisines et les vacuoles fusionnent. Elles expliquent d'autre part l'apport nécessaire de membrane pour constituer de si grandes structures.

L'augmentation de la taille de la zone noire des varicosités suggère une accumulation de ces vacuoles avec le temps.

### **3.3 ORIGINE(S) DES VACUOLES**

---

Les dendrites sont le siège des entrées synaptiques. Le métabolisme dans ces compartiments est donc très important, afin de produire assez d'énergie pour intégrer les signaux synaptiques, mais également afin de produire les protéines nécessaires aux synapses et au transport dendritique. Deux organites sont essentiels à ces deux fonctions : la mitochondrie pour produire de l'énergie, et le réticulum endoplasmique pour la synthèse de protéines, l'élimination des protéines mal repliées, et la signalisation avec la mitochondrie. Ces deux organites communiquent entre eux via des MAM, notamment par des échanges calciques. Or la littérature montre que ces deux organites sont impliqués dans la SLA. Nous nous demandons ici si l'un de ces organites, ou les deux, peuvent jouer un rôle ou participer à la formation de la vacuolisation des varicosités.

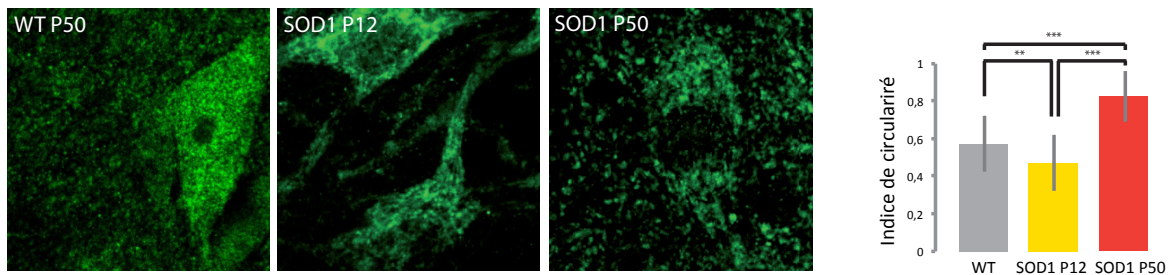
#### **3.3.1 ORIGINE MITOCHONDRIALE DES VACUOLES**

Un organite très présent dans les dendrites et dont la dynamique fusion/fission est active est la mitochondrie. De plus, il a été décrit des anomalies de la mitochondrie au cours de la SLA<sup>50</sup>. Nous nous sommes donc demandé si

les membranes de cet organite pouvaient être à l'origine des vacuoles et créer les structures observées au confocal dans les varicosités.

### 3.3.1.1 ETUDE DU RESEAU MITOCHONDRIAL

Pour vérifier l'état du réseau mitochondrial et ainsi faire l'hypothèse que les mitochondries pourraient se vacuoliser, nous avons étudié le réseau mitochondrial dans les somas par marquage immunohistochimique de Cox IV, protéine de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 20A<sub>1</sub>). Nous avons réalisé cette étude à P50, âge où les vacuoles sont petites. Le réseau est filamenteux chez les souris contrôles à P50, mais il est fragmenté chez les souris SOD1 à P50 : les mitochondries apparaissent rondes et isolées. Le logiciel ImageJ permet de calculer l'indice de circularité (Figure 20A<sub>2</sub>). Cet indice est proche de 1 lorsque les mitochondries sont rondes, et proche de 0 lorsque les mitochondries sont filamenteuses. L'indice de circularité augmente chez les souris SOD1 à P50 par rapport aux contrôles (WT :  $0,57 \pm 0,15$ ,  $n=46$  ; SOD1 P50 :  $0,82 \pm 0,14$ ,  $n=43$  ; MW,  $p\text{-value} < 0,001$ ), confirmant la fragmentation du réseau.



**Figure 20 : Fragmentation du réseau mitochondrial dans les souris SOD1.** Marquage immunohistochimique des mitochondries (Cox IV). L'indice de circularité des mitochondries augmente au cours de la maladie, montrant la fragmentation du réseau et l'arrondissement des mitochondries isolées

Or P50 est un stade présymptomatique où les motoneurones développent déjà des dysfonctionnements. Nous avons donc décidé de comparer le réseau mitochondrial à un stade plus jeune. A P12, le réseau mitochondrial paraît très filamenteux (Figure 20). Son indice de circularité est en effet légèrement plus bas

que dans les souris contrôles (WT :  $0,57 \pm 0,15$ ,  $n=46$  ; SOD1 P12 :  $0,47 \pm 0,15$ ,  $n=46$  ; MW,  $p\text{-value}=0,04$ ). Le réseau étant important pour les besoins énergétiques du motoneurone, on peut supposer que les besoins énergétiques sont comblés à P12.

### 3.3.1.2 LES MITOCHONDRIES SE VACUOLISENT DANS LES SOURIS SOD1

J'ai analysé le positionnement des mitochondries dans les varicosités grâce à des injections intracellulaires. J'ai ainsi pu réaliser des marquages d'immunohistochimie sur le motoneurone préalablement marqué. Au niveau des dendrites, la Figure 21A illustre la répartition mitochondriale mise en évidence par l'anticorps anti-COXIV. Le nombre de mitochondries (Figure 21B) est augmenté dans les varicosités des souris SOD1 (NT :  $2,5 \pm 1,78$ ,  $n=12$  ; SOD1 :  $6,22 \pm 3,07$ ,  $n=23$  ; MW,  $p\text{-value}=0,0002$ ), leur densité également (NT :  $0,6 \pm 0,4$ ,  $n=12$  ; SOD1 :  $1,33 \pm 0,66$ ,  $n=23$  ; MW,  $p\text{-value}=0,0001$ ). Cette augmentation du nombre de mitochondries, avec l'augmentation de l'indice de circularité, suggère éventuellement une dynamique de fission mitochondriale plus importante.

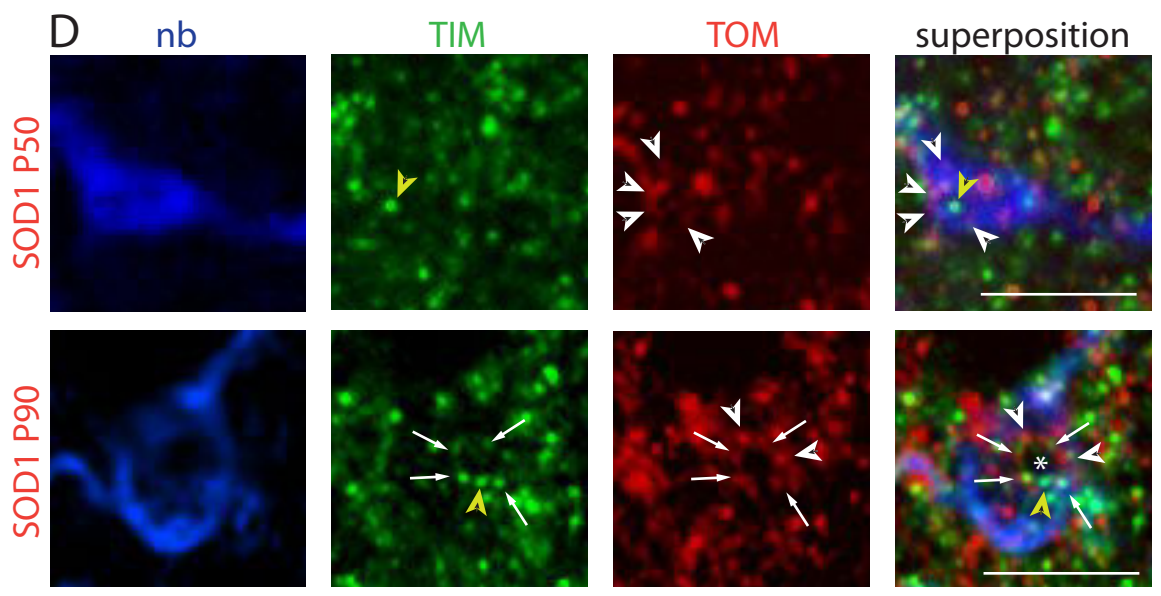
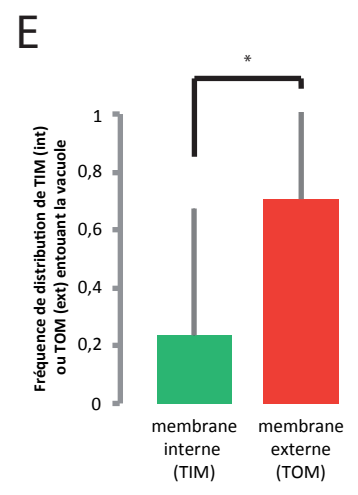
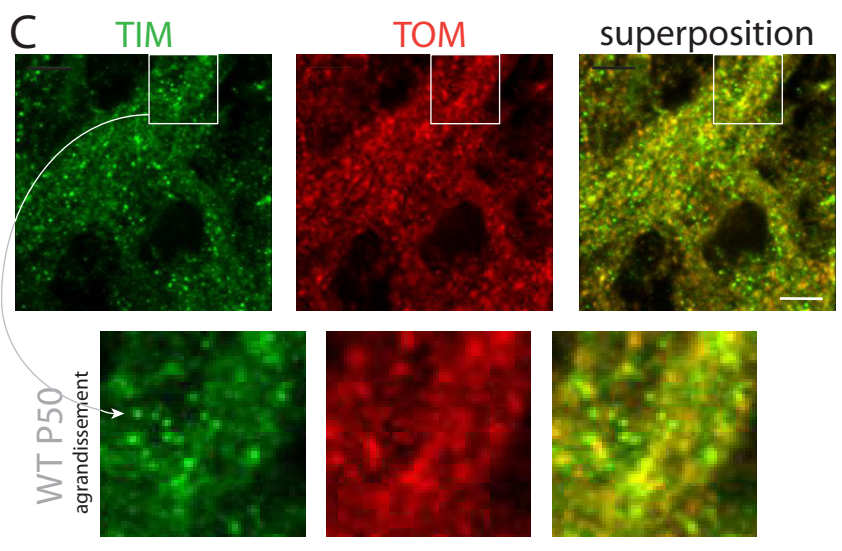
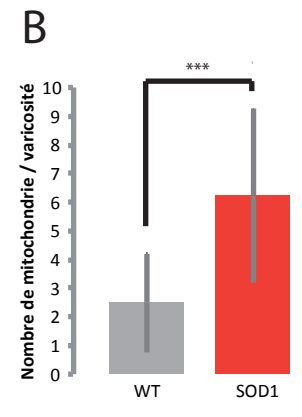
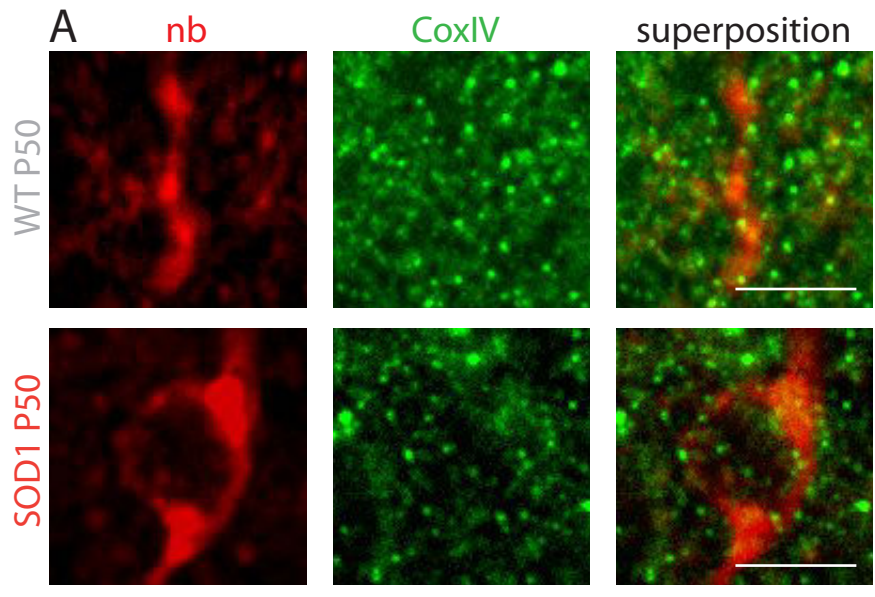
De manière intéressante, on observe des mitochondries marquées par le complexe CoxIV dans la zone noire de la varicosité. Elles sont réparties à la fois sur le pourtour et à l'intérieur. Pour vérifier la position de la membrane externe par rapport à la membrane interne et l'éventuelle vacuolisation de la mitochondrie, nous avons réalisé, sur un neurone injecté à la neurobiotine, un double marquage du complexe TIM-TOM (Figure 21C). Ce complexe est intéressant à utiliser car TIM est situé sur la membrane interne alors que TOM est sur la membrane externe de la mitochondrie. J'ai réalisé cette étude à P50, stade présymptomatique où les vacuoles sont petites, et à P90, stade symptomatique où les vacuoles sont nombreuses et où la zone noire est grande. Une différence importante que l'on observe entre les souris contrôles et les souris SOD1, c'est la distribution des membranes internes par rapport aux membranes externes. Dans les souris contrôles (Figure 21C), on voit une importante colocalisation entre les deux anticorps. Dans les souris SOD1, à P50 et à P90 (Figure 21D), on observe

quelques colocalisations (flèches blanches), mais moins nombreuses. On observe souvent une dissociation des marqueurs de membrane interne (pointe de flèche jaune) et externe (pointe de flèche blanche) des mitochondries. Ces marquages immunohistochimiques montrent donc une dissociation des membranes internes et externes dans les souris SOD1. La maladie affecte donc la structure des mitochondries dès P50 avec une fragmentation accrue des mitochondries pouvant conduire à un défaut énergétique important et à la mort cellulaire *in fine* si les mitochondries défectueuses ne sont pas éliminées par l'autophagie.

Il est intéressant d'observer la disposition des membranes internes et externes des mitochondries dans les zones noires des varicosités. En effet, dans les petites vacuoles (ici à P50), on observe un contour de la vacuole marqué par la membrane externe de la mitochondrie, tandis que la membrane interne est située à l'intérieur de la vacuole (Figure 21D). Je retrouve ce constat dans 70% des cas dans l'analyse de 17 varicosités dont la taille de la zone noire est inférieure à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 21E). La vacuole serait donc une expansion de l'espace intermitochondrial. Dans les plus grosses varicosités (à P90), on peut voir des mitochondries s'assembler en structures ovoïdes (astérisque). Cette organisation appuie l'hypothèse que les zones noires sont constituées de plusieurs vacuoles. Cette structure ovoïde serait une vacuole. A la différence des vacuoles de P50, ici elle est entourée par une alternance de mitochondries dont membranes externes et membranes internes colocalisent, mais également par des marquages de membranes internes et externes seuls (pointes de flèche blanches et jaunes). Les deux membranes de la mitochondrie : la membrane externe et la membrane interne, sont donc impliquées dans la formation de ces vacuoles.

Donc ces photos suggèrent que c'est l'espace intermitochondrial qui commence par se vacuoliser, puis que la membrane interne et la membrane externe de la mitochondrie seraient impliquées dans la vacuolisation. Cependant, le marquage TIM-TOM ne marque pas tous les contours des vacuoles présentes dans la zone noire.



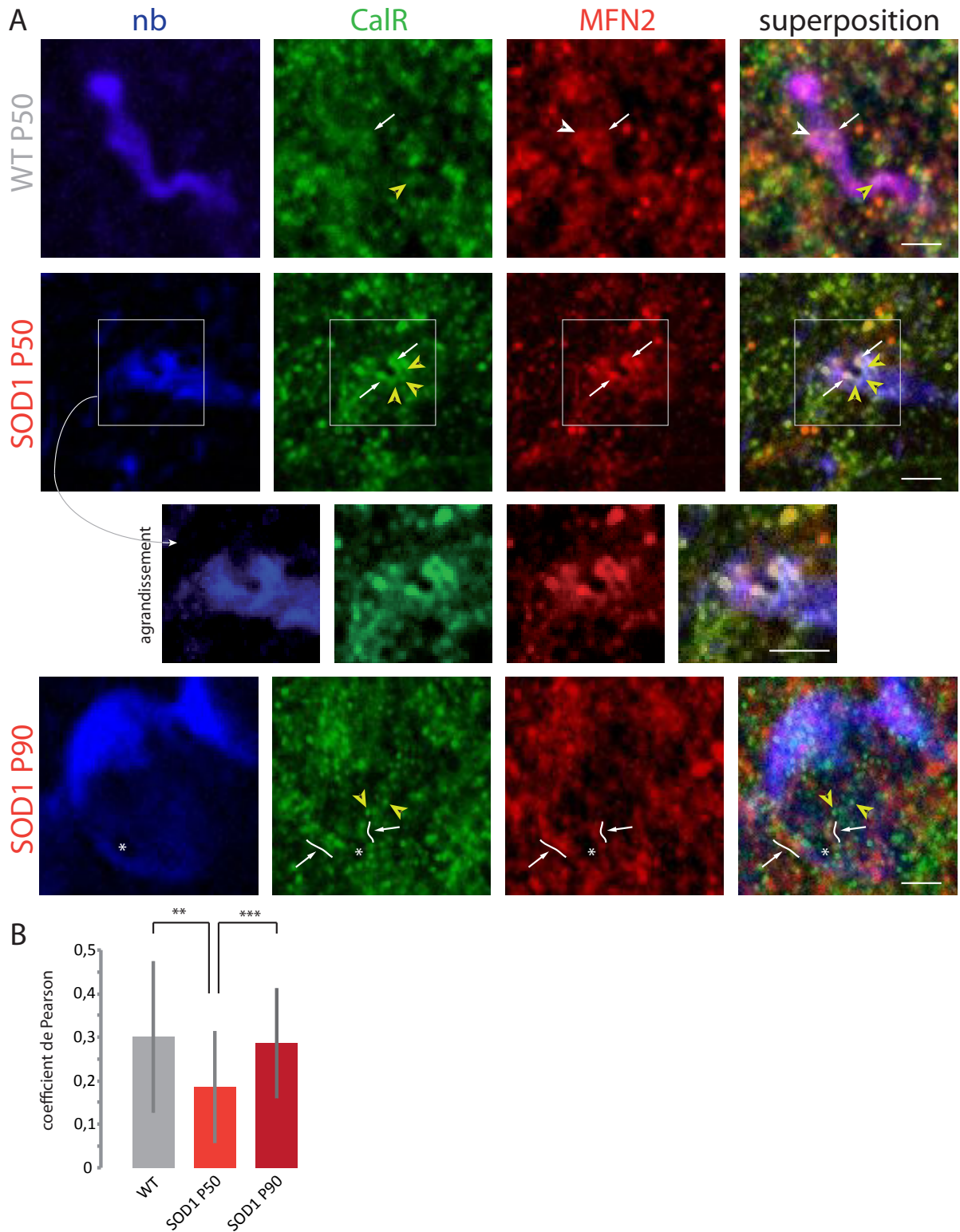


**Figure 21 : Les vacuoles sont en partie formées par des mitochondries.** **A** : A<sub>1</sub> : Somas marqués par immunohistochimie, de la chaîne respiratoire mitochondriale (CoxIV). A<sub>2</sub> : Analyse du réseau mitochondrial par analyse de la circularité des mitochondries. **B** : B<sub>1</sub> : Marquage CoxIV sur des motoneurones marqués à la neurobiotine (nb) pour visualiser la répartition des mitochondries dans les varicosités. B<sub>2</sub> : Histogramme quantifiant le nombre et la taille des mitochondries dans les souris SOD1 et contrôles. **C-D** : Co-marquage des marqueurs de membrane interne (TIM) et externe (TOM) de la mitochondrie dans les souris contrôles (C) et SOD1 P50 et P90 (D). Dans les souris SOD1 à 50 jours, dissociation des membranes externes (pointes de flèches blanches) et internes de certaines mitochondries (pointes de flèches jaunes). Présence de membrane externe sur le pourtour des vacuoles (pointes de flèches blanches). A 90 jours, les deux membranes marquent le pourtour des vacuoles, quelquefois de manière colocalisées (flèches blanches). **E** : Fréquence d'apparition à P50 dans les vacuoles <6µm, de membrane externe ou interne entourant la vacuole.

### 3.3.2 IMPLICATION DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LA VACUOLISATION

Sur des motoneurones préalablement injectés à la neurobiotine pour marquer les varicosités, j'ai marqué la calréticuline, protéine chaperonne du réticulum endoplasmique, et MFN2, protéine membranaire de la mitochondrie, présente également sur le RE aux zones de MAM seulement. Ainsi le marquage MFN2-calréticuline pourra donc nous informer sur la répartition du réticulum par rapport aux mitochondries, et sur la répartition des MAM, qui sont d'importantes zones de communication entre ces deux organites.

D'après la Figure 22, les dendrites de souris contrôles contiennent dans leurs varicosités ces deux organites. On distingue également quelques MAM dans les dendrites contrôles (flèches blanches). Dans les souris SOD1, le réticulum se fragmente, il forme des petites structures arrondies, isolées (pointes de flèches jaunes). Sa structure est donc modifiée par la maladie. Les mitochondries sont également plus rondes, comme le montre la Figure 22. Dans les varicosités des souris de 50 jours, le marquage mitochondrial MFN2 se répartit autour de la zone noire, comme on l'a vu dans la Figure 22. De manière intéressante, on retrouve également du marquage du réticulum en forme de fer à cheval qui entoure la zone noire (Figure 22A) (pointe de flèche verte).



**Figure 22 : Les vacuoles sont constituées de membranes de mitochondries et de reticulum. A :** Marquage de calreticulin (CaR) et de MFN2 pour localiser le reticulum (pointe de flèche jaune) et les mitochondries (pointe de flèche blanche) dans les dendrites de souris contrôles et SOD1. Des colocalisations montrent des MAM (flèche blanche). A 50 jours, les souris SOD1 montrent des vacuoles dans les dendrites. Celles-ci sont délimitées par des membranes de mitochondrie et du

réticulum en alternance, et des MAM. A 90 jours, les varicosités sont plus grosses et contiennent du réticulum et des membranes mitochondriales. **B** : Analyse de la proportion de MAM, par analyse du degré de colocalisation entre réticulum et mitochondrie (coefficient de Pearson). Barre = 2µm

Chaque extrémité du fer à cheval est en colocalisation avec MFN2, montrant des MAM (flèches blanches). Ainsi à 50 jours, les vacuoles sont entourées de marquage de mitochondries et de réticulum. En revanche, l'intérieur de la vacuole ne possède pas de marquage du réticulum. A 90 jours, la zone noire s'est agrandie. On distingue quelques zones bleuâtres à l'intérieur, zones dans lesquelles diffuse la neurobiotine. On peut ainsi entrevoir cette fois la localisation et la taille de plusieurs vacuoles (astérisque) au sein de la zone noire. De même qu'avec les autres marquages mitochondriaux, on distingue des marquages de membranes mitochondriales le long de vacuoles. Une grande différence avec P50, c'est que du marquage du réticulum se retrouve également à l'intérieur de la zone noire, probablement du au fait que la zone noires est constituée de nombreuses vacuoles (pointes de flèches jaunes). Enfin, de nombreuses MAM sont visibles, notamment pour entourer les vacuoles (délimitées par les vagues blanches marquées par les flèches blanches). Pour déterminer si le nombre des MAM est changé au cours de la maladie, j'ai utilisé l'analyse « Coloc 2 » de ImageJ. Cette analyse donne le coefficient de Pearson, qui représente le degré de colocalisation. Ce coefficient est compris entre -1 et 1 : à 1, la colocalisation est parfaite, à -1, c'est l'anticolocalisation, c'est-à-dire qu'aucun pixel ne colocalise, et tous les pixels non marqués par un canal sont marqués par l'autre canal. Pour vérifier que cette analyse est juste et que le coefficient de Pearson est significatif, j'ai utilisé l'analyse de Costes, qui compare le coefficient de Pearson à une même analyse dont les pixels des deux canaux sont répartis de manière aléatoire. Ainsi, plus la corrélation  $r$  de l'analyse de Costes est proche de 1, plus l'analyse est significative. Je n'ai conservé dans cette étude que les coefficients de Pearson dont l'analyse de Costes donne  $r=1$ . L'analyse de la colocalisation entre les deux marqueurs montre à P50 une diminution du coefficient de Pearson par la maladie (WT :  $0,30\pm 0,17$ ,  $n=35$  ; SOD1 :  $0,18\pm 0,13$ ,  $n=27$  ; MW,  $p\text{-value}=0,008$ ), donc une

diminution du nombre de MAM par unité de surface (Figure 22B). En revanche, entre P50 et P90, le coefficient de Pearson augmente (P50 :  $0,18 \pm 0,13$ ,  $n=27$  ; P90 :  $0,28 \pm 0,13$ ,  $n=23$  ; MW,  $p\text{-value}=0,001$ ), donc le nombre de MAM augmente à un stade plus avancé. Cependant, à cet âge, le réticulum et la mitochondrie étant fragmentés, on devrait s'attendre à voir moins de MAM. Ces colocalisations entre réticulum et mitochondrie sont probablement des colocalisations non fonctionnelles. Donc la communication est altérée dès P50 entre le réticulum et la mitochondrie. Cette évolution confirme l'existence d'un stress entre le réticulum et les mitochondries, stress déjà mis en évidence par la modification de la structure et du réseau de ces deux organites.

Les vacuoles sont donc constituées de membrane de mitochondrie et de membrane de réticulum. Les MAM sont certainement impliqués dans la formation des vacuoles puisqu'ils sont présents sur le pourtour de la zone noire. Des bouts de réticulum sont également présents à l'intérieur des vacuoles.

### **3.4 DEF AUT D'ELIMINATION DES VACUOLES PAR DEF AUT DU MECANISME D'AUTOPHAGIE**

---

Il a été reporté de nombreux dysfonctionnements dans l'autophagie au cours de la SLA<sup>50,88,92,93,95</sup>. Mais ces études ont été réalisées soit par immunoempreintes, soit par immunohistochimie, mais dans ce cas seuls les somas ont été étudiés. Il était intéressant ici d'étudier l'autophagie dans les dendrites, et de comparer les déficiences de l'autophagie dans les somas et dans les dendrites. En effet, les dendrites représentent le volume le plus important d'un motoneurone. C'est également au niveau des dendrites que la plupart des entrées synaptiques sont reçues. L'intégration des signaux nécessite un bon fonctionnement des mitochondries, source importante d'énergie, en plus d'une bonne signalisation avec le RE. L'autophagie y est donc très importante pour

assurer l'élimination des organites défectueux et leur renouvellement. Enfin, les dendrites de souris SOD1 présentent de nombreuses vacuoles qui grossissent avec l'avancée de la maladie. Nous formulons l'hypothèse que l'autophagie est également déficiente dans les dendrites, expliquant le manque d'élimination des mitochondries défectueuses.

### 3.4.1 DANS LA MOELLE

Pour analyser globalement l'autophagie dans la moelle ventrale, où les motoneurones sont localisés, nous avons réalisé des analyses par immunoempreinte (Figure 23). Il était intéressant d'étudier l'autophagie à différents âges pour évaluer l'impact de l'évolution de la maladie sur l'autophagie. Nous avons utilisé différents âges pour étudier l'évolution de l'autophagie :

- P12, les souriceaux ne développent pas de signes de la maladie, malgré la présence de la mutation, donc des compensations existent,
- P50, les motoneurones développent déjà plusieurs dysfonctionnements mais la jonction neuromusculaire est toujours fonctionnelle,
- P70, la jonction neuromusculaire des unités motrices de type FF est dénervée,
- P90, les jonctions neuromusculaires des unités motrices de type FR commencent à se dénervier, et les premiers symptômes de la maladie apparaissent.

Beclin et Atg5 sont deux protéines impliquées dans l'induction de l'autophagie. A P12, le niveau d'Atg 5 est augmenté dans la souris SOD1 par rapport à la souris contrôle P12 (Figure 23A). Le niveau de Beclin n'est pas modifié par la mutation à P12. Donc l'induction de l'autophagie est plus forte à P12. LC3 quantifie le nombre de vacuoles totales d'autophagie. Or ce niveau est augmenté. Donc l'autophagie est plus forte à P12. p62 est un marqueur du flux d'autophagie, son niveau reflète l'aboutissement de l'autophagie par la fusion des

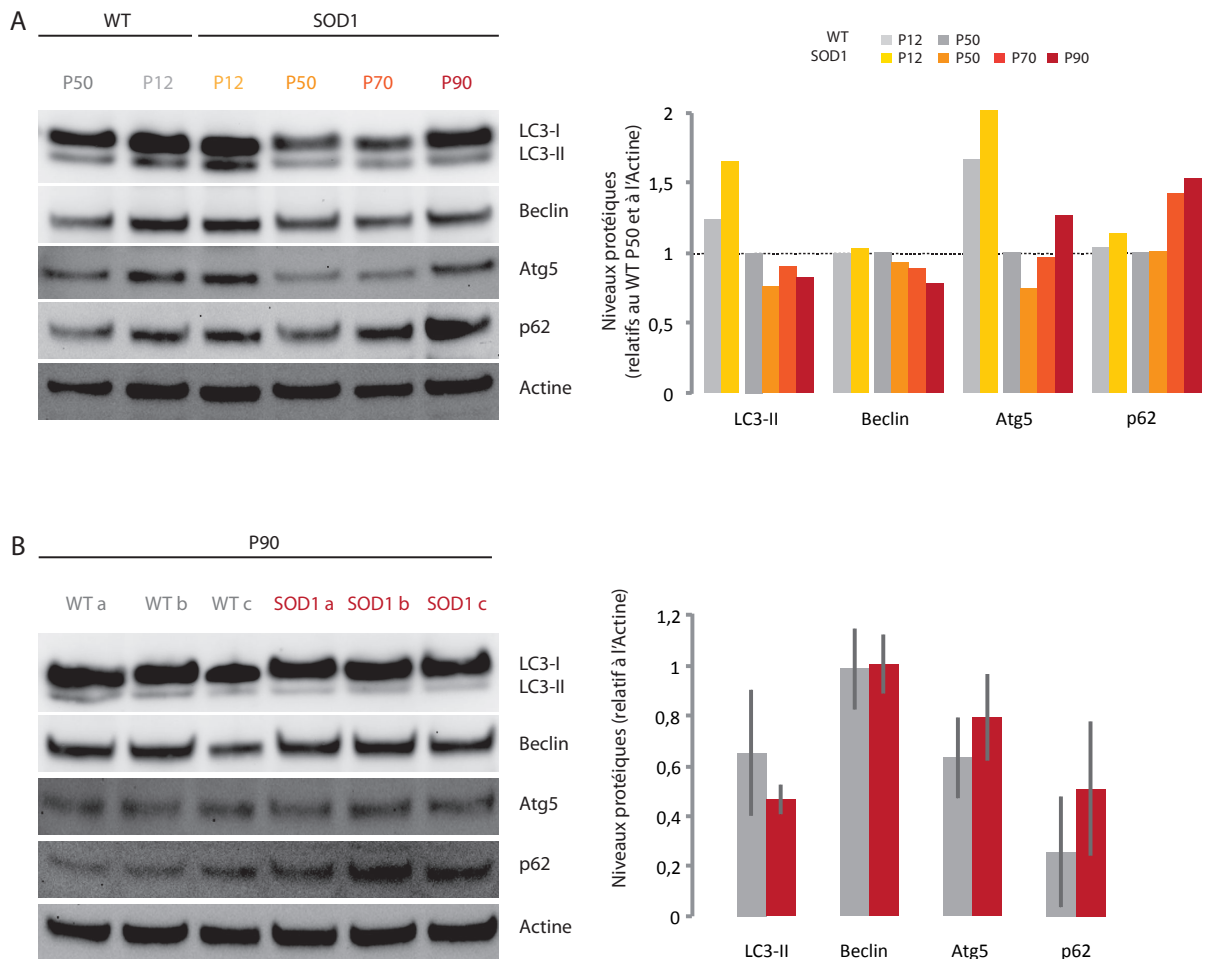


autophagosomes avec les lysosomes pour assurer la dégradation finale du contenu des vacuoles d'autophagie. Son accumulation indique une mauvaise élimination des autophagosomes et donc une inhibition de l'autophagie. A P12, le niveau de p62 est inchangé. Donc l'élimination des nombreux autophagosomes formés par la forte induction de l'autophagie est bonne. L'autophagie est fonctionnelle.

A P50, les niveaux de Atg5 et Beclin sont plus faibles que dans la souris contrôle à P50. L'initiation de l'autophagie est donc plus faible. Le niveau de LC3 est également plus faible, donc il y a moins de vacuoles d'autophagie à P50. Ce résultat est probablement dû au fait que l'initiation est plus faible. En revanche, le niveau de p62 est inchangé par rapport à la souris WT, signifiant que l'élimination est correcte. Donc globalement, l'autophagie est fonctionnelle mais elle est diminuée à P50. A P70 et P90, le niveau d'Atg 5 augmente. Mais Beclin diminue. Atg5 étant recrutée avant Beclin lors du processus d'initiation de l'autophagie, on en déduit que l'initiation est défectueuse lors du recrutement de Beclin. On retrouve en effet un plus faible nombre de vacuoles d'autophagie (LC3). Cependant, il est intéressant de noter que les niveaux de p62 augmentent à ces âges. Ce résultat indique une accumulation des autophagosomes qui ne sont pas éliminés. Donc le flux est bloqué, révélant que l'autophagie est inhibée dès P70.

Ces analyses ont été faites sur une souris de chaque phénotype et de chaque âge, répétées trois fois. Pour confirmer le fait que l'autophagie est déficiente à un stade symptomatique, nous avons réalisé une nouvelle immunoempreinte avec les mêmes facteurs, cette fois en utilisant 3 nouvelles souris contrôles et 3 nouvelles souris SOD1 à P90 (Figure 23B). L'histogramme de la Figure 23B représente les moyennes des niveaux des 4 souris pour chaque phénotype. On retrouve comme dans l'étude précédente une augmentation de l'Atg5 (WT :  $0,63 \pm 0,16$  ; SOD1 :  $0,79 \pm 0,17$ , n=4), en revanche Beclin est inchangé (WT :  $0,99 \pm 0,16$ , SOD1 :  $1,00 \pm 0,12$ , n=4). Donc, à P90, on observe une augmentation de l'induction de l'autophagie. En revanche le nombre de vacuoles (LC3) étant diminué (WT :  $0,65 \pm 0,25$ , SOD1 :  $0,47 \pm 0,06$ , n=4) on en déduit que l'autophagie est plus faible à P50 dans les souris SOD1. Enfin, l'augmentation de

p62 (WT :  $0,26 \pm 0,22$ , SOD1 :  $0,51 \pm 0,27$ ) nous confirme qu'elle se bloque tardivement.



**Figure 23 : Etude de l'expression des protéines impliquées dans l'autophagie. A :** Evolution de l'autophagie avec la maladie (comparaison WT- SOD1) et avec l'âge (P12, P50, P70, P90) des protéines impliquées dans l'initiation de l'autophagie (Beclin, Atg5), les vacuoles d'autophagie (LC3) et les autophagosomes (p62). **B :** Immunoempreinte réalisée sur 4 souris contrôles et 4 souris SOD1 à P90, sur les mêmes protéines qu'en A. Chaque barre de l'histogramme représente une moyenne des 4 souris. Les histogrammes quantifient les bandes après normalisation par rapport à l'actine, une protéine cytosolique qui constitue un contrôle de chargement sur le gel de migration.

Pour conclure, à P12, l'autophagie est augmentée, alors que les motoneurones n'ont pas de problèmes physiologiques, ce qui suggère que l'autophagie joue un rôle dans la compensation de la mutation SOD1. L'autophagie est déficiente dès P50, car l'induction et le nombre de vacuoles



d'autophagie marquées par LC3 est diminuée, et elle est inefficace à partir de P70 car elle est bloquée.

### **3.4.2 DANS LE MOTONEURONE SPECIFIQUEMENT**

L'étude de la moelle ventrale ne comprend pas que les motoneurones. Pour réaliser une étude plus précise sur les motoneurones uniquement, j'ai réalisé des marquages immunohistochimiques.

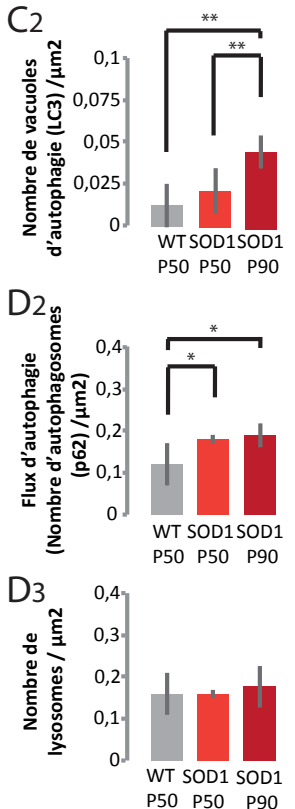
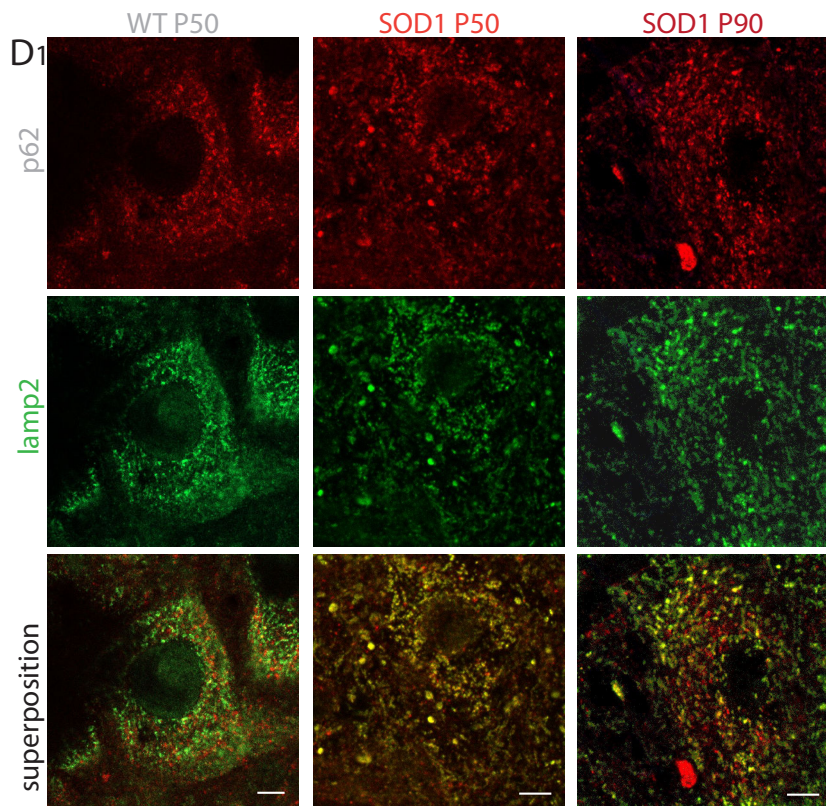
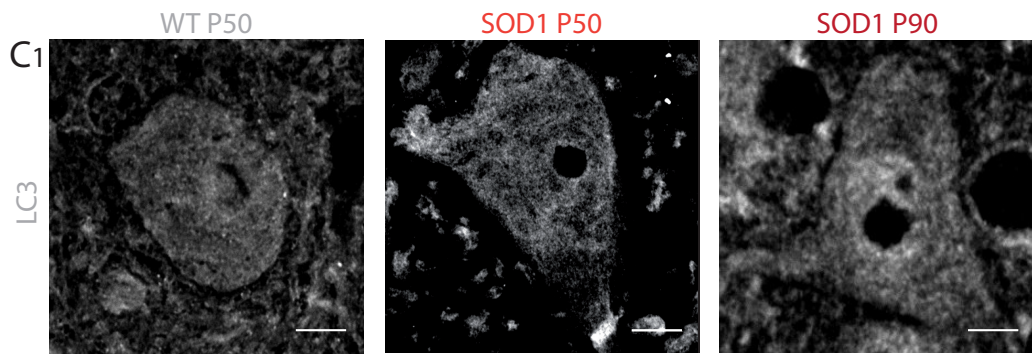
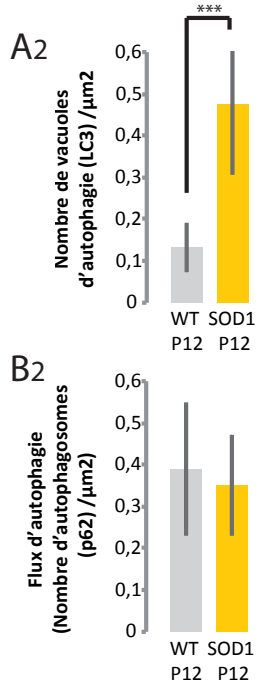
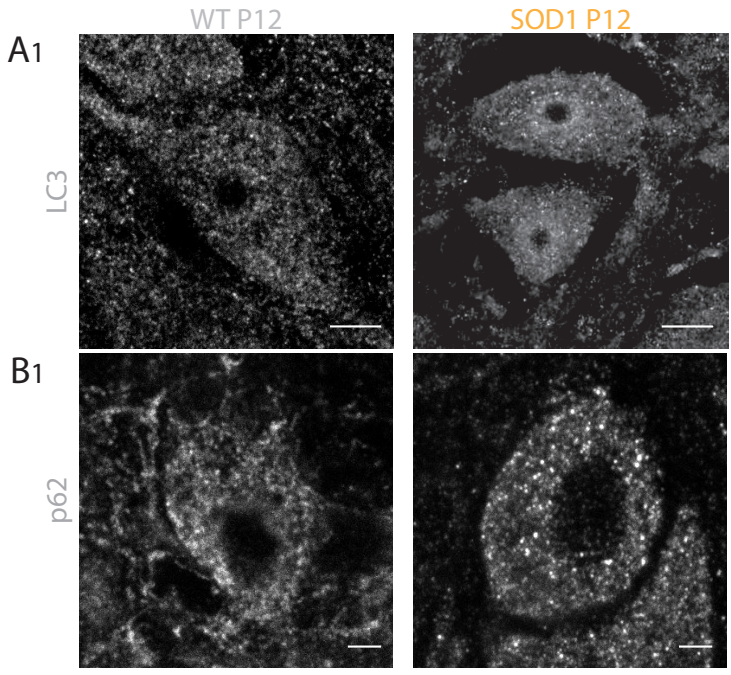
#### **3.4.2.1 ETUDE DES SOMAS**

Pour étudier le soma des motoneurones, j'ai utilisé des techniques d'immunohistochimie sur des moelles de souris perfusées, dont le marquage ChaT pour reconnaître les motoneurones. Nous avons choisi trois âges pour quantifier et mesurer l'efficacité de l'autophagie selon l'évolution de la maladie sur le soma : P12, où les souris sont bébés, âge bien avant le début des symptômes, P50, âge juste avant la dénervation neuromusculaire, et P90, âge des premiers symptômes. Toutes les vacuoles d'autophagie (Figure 24A) sont marquées par immunohistochimie par LC3. Ce marqueur nous permet de conclure, selon le nombre de vacuoles, si, de manière générale, l'autophagie est augmentée, diminuée ou normale. Pour observer et quantifier le flux de l'autophagie et la dégradation des vacuoles d'autophagie, j'ai marqué des motoneurones avec p62 et LAMP2. P62 identifie les autophagosomes qui doivent fusionner avec les lysosomes (LAMP2, marqueur lysosomal). Leur accumulation met en évidence une mauvaise dégradation des autophagosomes, donc un blocage de l'autophagie. Ce marqueur décrit donc le flux. Il est intéressant d'étudier la quantité de lysosomes car l'élimination des autophagosomes peut être affectée par une baisse de leur nombre.

Chez toutes les souris étudiées, des vacuoles d'autophagies (LC3) sont visibles (points blancs), mais dans des proportions différentes (Figure 24). Pour quantifier le nombre de vacuoles d'autophagie (LC3) dans chaque phénotype, j'ai

compté leur nombre dans plusieurs somas de chaque phénotype, que j'ai divisé par la surface de chaque soma étudié. Le premier résultat étonnant est qu'il y a une augmentation de l'autophagie à P12 dans les souris SOD1 (Figure 24A), (WT P12 :  $0,13 \pm 0,06$  vacuoles/ $\mu\text{m}^2$ , n=8 ; SOD1 P12 :  $0,48 \pm 0,17$  vacuoles/ $\mu\text{m}^2$ , n=8 ; MW, p-value = 0,0003). En revanche, il n'y a pas de différence du nombre d'autophagosomes (p62) entre les souris malades et contrôles à P12 (Figure 24B), donc le flux est normal (WT P12 :  $0,39 \pm 0,16$  autophagosomes/ $\mu\text{m}^2$ , n=5 ; SOD1 P12 :  $0,35 \pm 0,12$  autophagosomes/ $\mu\text{m}^2$ , n=6 ; MW, p-value = 0,66). L'autophagie est donc augmentée et efficace à P12, elle est exacerbée chez les souriceaux. Or à cet âge, les motoneurones compensent les effets dus à la mutation, car la souris ne développe pas encore de symptômes. L'autophagie joue donc probablement un rôle dans le maintien de l'homéostasie des motoneurones, pour éliminer agrégats et organites défectueux. Elle peut expliquer l'absence de symptômes à cet âge.

A P50, dans les deux phénotypes, on observe un nombre de vacuoles d'autophagie équivalent entre souris WT et souris SOD1 (Figure 24C), (WT P50 :  $0,01 \pm 0,01$  vacuoles /  $\mu\text{m}^2$ , n=8 ; SOD1 P50 :  $0,02 \pm 0,01$  vacuoles /  $\mu\text{m}^2$ , n=8 ; MW, p-value = 0,06). En revanche, le nombre d'autophagosomes est augmenté à P50 entre souris WT et SOD1 (Figure 24D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub>) (WT P50 :  $0,12 \pm 0,05$  autophagosomes/ $\mu\text{m}^2$ , n=8 ; SOD1 P50 :  $0,17 \pm 0,01$  autophagosomes/ $\mu\text{m}^2$ , n=7 ; MW, p-value = 0,01). Ainsi à P50 le flux de l'autophagie est bloqué dans les somas des motoneurones de souris SOD1. Or à P50 on note déjà des mitochondries défectueuses, le réseau est fragmenté. L'inhibition de l'autophagie peut expliquer l'accumulation des organites défectueux.



**Figure 24 : Inhibition de l'autophagie au niveau du soma, au cours de la SLA.** **A** : Marquage par immunohistochimie (A<sub>1</sub>) et histogramme correspondant (A<sub>2</sub>) des vacuoles d'autophagie (LC3) dans les somas des motoneurones des souris. **B** : Marquage par immunohistochimie (B<sub>1</sub>) et histogramme correspondant (B<sub>2</sub>) des autophagosomes (p62) dans les somas des motoneurones des souris. **C** : Marquage par immunohistochimie (C<sub>1</sub>) et histogramme correspondant (C<sub>2</sub>) des vacuoles d'autophagie (LC3) dans les somas des motoneurones de souris adultes. **D** : Marquage par immunohistochimie (D<sub>1</sub>) et histogramme correspondant (D<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>) d'autophagosomes (p62) qui doivent fusionner avec les lysosomes (lamp2) dans les motoneurones de souris adultes.

A un stade symptomatique (P90), on note une augmentation du nombre de vacuoles d'autophagie chez les souris SOD1 (SOD1 P50 :  $0,02 \pm 0,01$  phagophores/ $\mu\text{m}^2$ , n=8 ; SOD1 P90 :  $0,05 \pm 0,01$  phagophores/ $\mu\text{m}^2$ , n=8 ; MW, p-value = 0,005), alors que le flux est équivalent à celui présent à P50 (SOD1 P50 :  $0,17 \pm 0,01$  autophagosomes/ $\mu\text{m}^2$ , n=3 ; SOD1 P90:  $0,19 \pm 0,03$  autophagosomes/ $\mu\text{m}^2$ , n=6 ; MW, p-value = 0,22). Les vacuoles d'autophagie sont plus nombreuses à P90, mais puisque le flux est toujours bloqué, l'autophagie est inhibée. L'augmentation de l'autophagie à P90 peut être une réponse des motoneurones à l'accumulation des organites défectueux qui ne sont pas éliminés depuis P50.

Ces résultats montrent une défaillance de l'autophagie dans les somas des motoneurones de souris SOD1 spécifiquement. Elle est inhibée dès P50 et ce jusqu'à P90, stade symptomatique de la maladie.

### 3.4.2.2 DANS LES DENDRITES

La plus grande surface d'un motoneurone est l'arborisation dendritique. L'autophagie dans ces compartiments peut y être différente. Les analyses de la moelle et des somas montrant tous deux des dysfonctionnements de l'autophagie, nous nous sommes demandé si le dysfonctionnement était également présent dans les dendrites et s'il pouvait expliquer que les vacuoles observées dans les varicosités ne soient pas éliminées. Cette étude est également particulièrement intéressante puisque l'autophagie n'a pas encore été décrite dans les dendrites des souris atteintes de SLA. Pour étudier spécifiquement les dendrites, j'ai réalisé, sur des motoneurones marqués intracellulairement à la

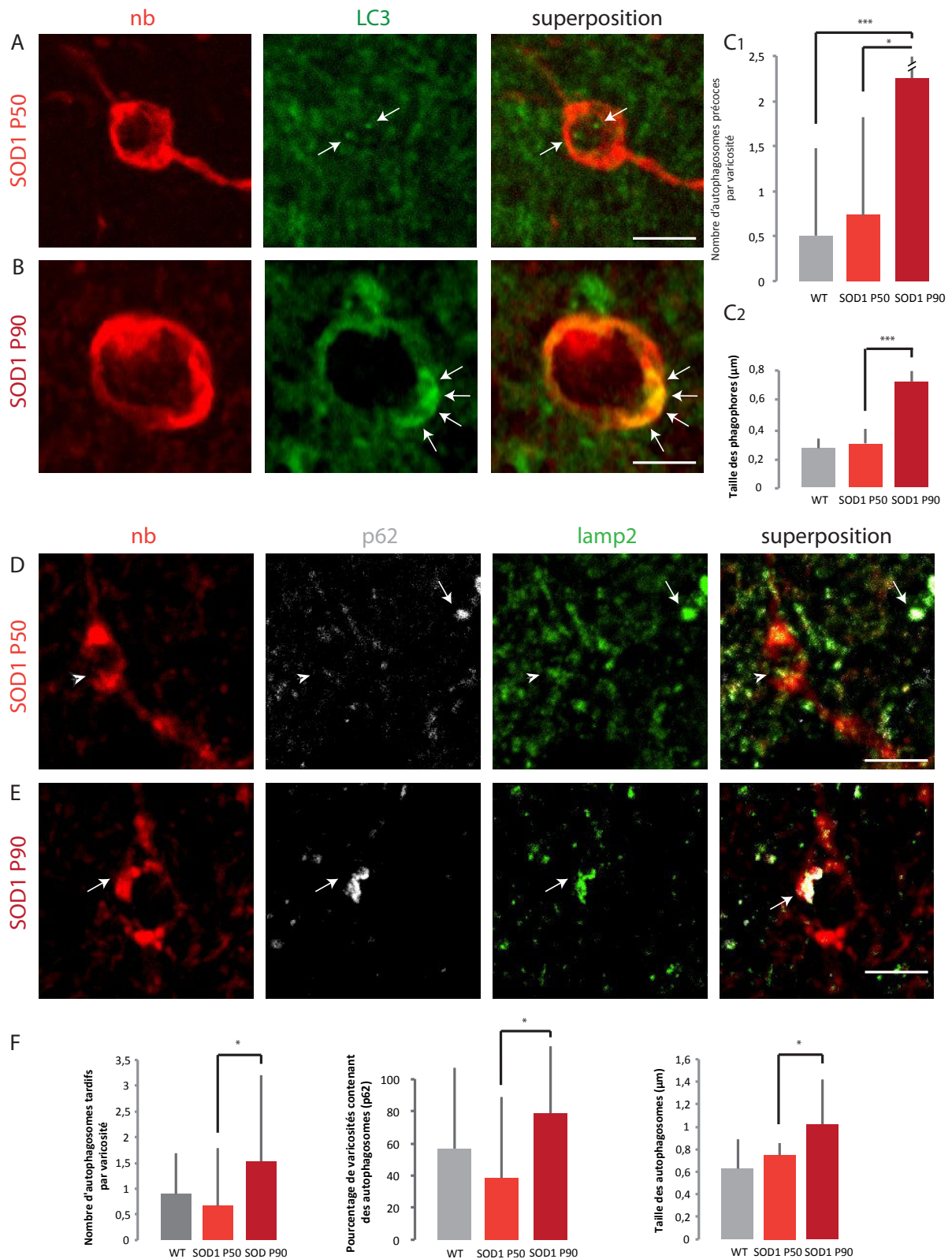
neurobiotine, des marquages immunohistochimiques LC3 pour marquer toutes les vacuoles d'autophagie, puis p62 et LAMP2 pour quantifier le flux et les autolysosomes. J'ai ensuite observé au confocal la répartition des vacuoles d'autophagie au niveau des varicosités. Comme on observe l'accumulation de vacuoles spécifiquement dans les zones noires, je n'ai pas réalisé cette étude à P12 comme lors des analyses de moelles et des somas. En effet, il n'y a pas de vacuoles à P12. De plus, l'injection intracellulaire de neurobiotine nécessite une chirurgie longue qui est éprouvante pour la souris. Or les souriceaux ne survivent pas assez longtemps à la chirurgie pour permettre de marquer un motoneurone. J'ai donc réalisé cette étude à P50 et P90 uniquement.

La Figure 25 montre la présence de vacuoles d'autophagie (LC3 et p62) dans les varicosités des souris SOD1. La présence des vacuoles d'autophagie (flèches blanches, Figure 25A et B) n'est pas systématique dans les varicosités. J'ai donc quantifié le pourcentage de varicosités présentant des phagophores. Ce pourcentage n'est pas changé de manière significative par la maladie à P50 (WT :  $25 \pm 45\%$ ,  $n=16$  ; SOD1 P50 :  $43 \pm 50\%$ ,  $n=42$  ; MW,  $p\text{-value}=0,2$ ). Pour vérifier la densité, j'ai compté le nombre de vacuoles d'autophagie moyenne par varicosités (Figure 25C<sub>1</sub>), que j'ai divisé par la longueur de la varicosité. La densité de vacuoles d'autophagie par varicosité est inchangée (WT :  $0,50 \pm 0,97$  vacuoles/ $\mu\text{m}$ ,  $n=16$  ; SOD1 P50 :  $0,74 \pm 1,11$  vacuoles/ $\mu\text{m}$ ,  $n=42$  ; MW,  $p\text{-value}=0,3$ ). La taille de chaque vacuole (Figure 25C<sub>2</sub>) est également inchangée (WT :  $0,28 \pm 0,06$   $\mu\text{m}$ ,  $n=16$  ; SOD1 P50 :  $0,32 \pm 0,09$   $\mu\text{m}$ ,  $n=42$  ; MW,  $p\text{-value}=0,4$ ). Ainsi, à P50, la distribution et la taille des vacuoles est la même. L'étude des autophagosomes à P50 (Figure 25D) montre une dégradation des autophagosomes inchangée : le pourcentage de varicosités contenant des autophagosomes est le même que dans les souris contrôles (WT :  $57 \pm 51\%$ ,  $n=23$  ; SOD1 P50 :  $38 \pm 51\%$ ,  $n=13$  ; MW,  $p\text{-value}=0,3$ ), ainsi que la densité (WT :  $0,33 \pm 0,41$  autophagosomes/ $\mu\text{m}$ ,  $n=23$  ; SOD1 P50 :  $0,19 \pm 0,3$  autophagosomes/ $\mu\text{m}$ ,  $n=13$  ; MW,  $p\text{-value}=0,2$ ) et la taille des autophagosomes (WT :  $0,63 \pm 0,26$   $\mu\text{m}$ ,  $n=32$  ; SOD1 P50 :  $0,74 \pm 0,12$   $\mu\text{m}$ ,  $n=11$  ; MW,  $p\text{-value}=0,4$ ) (Figure 25F). Donc à P50, le flux de l'autophagie est

inchangé. Ce résultat est cependant surprenant. En effet, on observe la présence de vacuoles dans les varicosités, dont on a vu qu'elles sont pathologiques. L'autophagie devrait être exacerbée dans les varicosités, afin d'éliminer ces vacuoles. Ainsi, même si le nombre de vacuoles d'autophagie et le flux de l'autophagie sont similaires aux souris contrôles, l'autophagie est en réalité déficiente car elle n'est pas assez activée.

A un stade symptomatique (P90), le pourcentage de varicosités contenant des vacuoles d'autophagie n'augmente pas (SOD1 P50 :  $43 \pm 50\%$ ,  $n=42$  ; SOD1 P90 :  $52 \pm 51\%$ ,  $n=23$  ; MW,  $p\text{-value}=0,3$ ), mais la densité des vacuoles d'autophagie par varicosité est augmentée (Figure 25C<sub>1</sub>). La taille de chaque vacuole augmente (SOD1 P50 :  $0,28 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ,  $n=16$  ; SOD1 P90 :  $0,32 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ,  $n=42$  ; MW,  $p\text{-value}=0,4$ ) (Figure 25C<sub>2</sub>), comme le montre l'exemple de la Figure 25B. Donc l'autophagie augmente dans certaines varicosités. L'étude des autophagosomes montre en revanche une nette différence dans la dégradation des autophagosomes entre P50 et P90 (Figure 25E). La densité des autophagosomes (Figure 25F) augmente (SOD1 P50 :  $0,67 \pm 1,12$ ,  $n=13$  ; SOD1 P90 :  $1,53 \pm 1,68$ ,  $n=19$  ; MW,  $p\text{-value}=0,02$ ), ce qui montre un blocage de l'autophagie dans les varicosités à ce stade. L'augmentation du pourcentage de varicosités contenant des vacuoles (SOD1 P50 :  $38 \pm 51\%$ ,  $n=13$  ; SOD1 P90 :  $79 \pm 42\%$ ,  $n=19$  ; MW,  $p\text{-value}=0,02$ ) et de la taille des autophagosomes confirment ce résultat (SOD1 P50 :  $0,75 \pm 0,11 \mu\text{m}$ ,  $n=11$  ; SOD1 P90 :  $1,02 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ,  $n=29$  ; MW,  $p\text{-value}=0,04$ ). L'autophagie dans les dendrites est donc perturbée à P90, les autophagosomes ne sont pas dégradés, le flux est bloqué, l'autophagie est dysfonctionnelle.





**Figure 25 : Les vacuoles d'autophagie s'accumulent autour des vacuoles de varicosité. A-B :** Vacuoles d'autophagie marquées en immunohistochimie par l'anticorps anti-LC3, dans les varicosités dendritiques (nb) vacuolisées de souris SOD1 à 50 jours (**A**) et 90 jours (**B**). Les flèches pointent les vacuoles d'autophagie. **C :** Evolution du nombre et de la taille des vacuoles

d'autophagie avec la maladie. **D-E** : Autophagosomes et lysosomes marqués par des anticorps marquant p62 et lamp2, dans les varicosités dendritiques vacuolisées de souris SOD1 à 50 jours (**D**), et à 90 jours (**E**). Les flèches pointent les autolysosomes. Les pointes de flèches pointent les lysosomes. **F** : évolution du nombre et de la taille des autophagosomes avec la maladie.

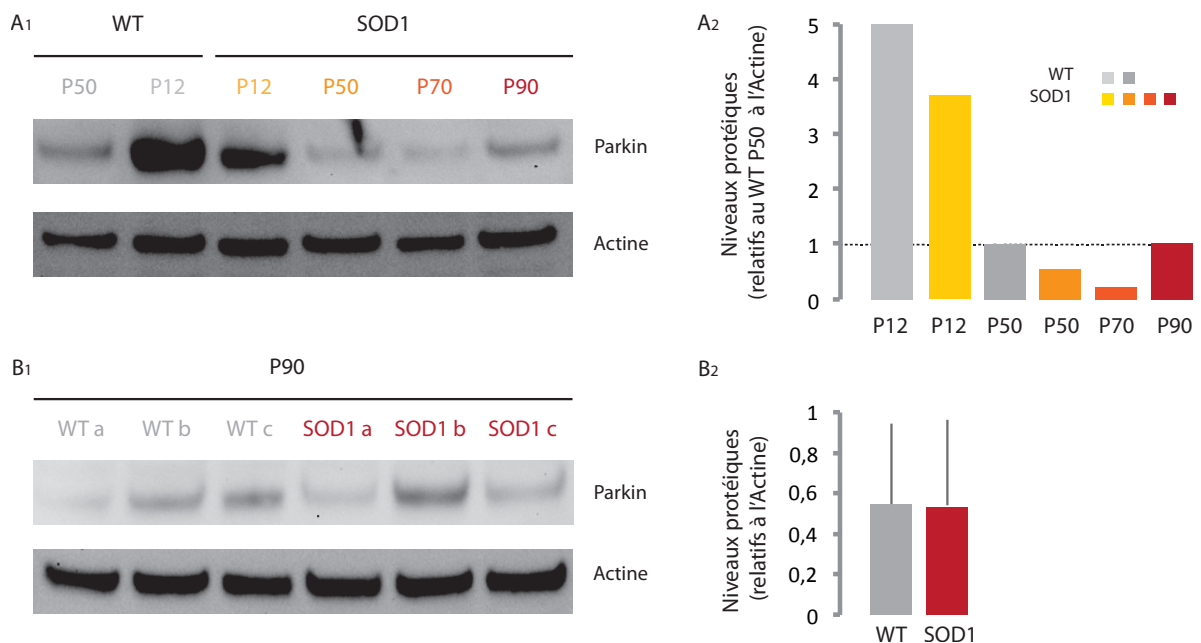
A P90, une observation intéressante est qu'il n'y a plus de vacuoles d'autophagie dans les vacuoles de varicosités. Celles-ci s'accumulent en revanche autour de la zone noire des varicosités (Figure 25B et E). Les vacuoles d'autophagie pourraient s'accumuler afin d'éliminer les vacuoles des zones noires des varicosités, mais l'augmentation de la taille de la zone noire avec le temps suggère que les vacuoles de varicosité ne sont pas englobées dans les vacuoles d'autophagie. Le blocage de l'autophagie n'est pas le premier problème de l'autophagie, c'est l'adressage des organites défectueux (mitochondries et réticulum) aux vacuoles de varicosité qui semble également être déficient. Donc le processus de l'autophagie serait dysfonctionnel dans les dendrites pour recruter les mitochondries et le réticulum endommagés et pour les englober dans les vacuoles d'autophagie.

### **3.4.3 PERTURBATION DE LA MITOPHAGIE DANS LES SOURIS SOD1**

La mitophagie doit permettre d'éliminer les mitochondries défectueuses. Nous avons étudié Parkin, qui est une molécule impliquée dans le recrutement des mitochondries lors de la mitophagie. Comme les vacuoles grossissent avec le temps, nous avons étudié la quantité de Parkin exprimée avec le temps par immunoempreinte (Figure 26A). A P12, Parkin est très exprimée, aussi bien dans les souris contrôles que les souris SOD1. Le niveau de Parkin est cependant plus faible dans les souris SOD1, mettant en évidence un recrutement légèrement déficient dès P12, mais encore efficace car le niveau est élevé. A P50 et P70, les niveaux de Parkin sont extrêmement faibles (Figure 26A). Cela signifie que les mitochondries endommagées ne sont pas incluses dans le processus de l'autophagie. Or c'est à cet âge que les vacuoles de varicosité apparaissent et grossissent. La mitophagie peut donc être mise en cause dans l'apparition des



vacuoles de varicosités, par défaut de Parkin qui ne recruterait pas les mitochondries pour les intégrer dans les phagophores. A P90, le niveau de Parkin est similaire aux souris contrôles. Les mitochondries endommagées vacuolisées étant nombreuses, on s'attend au contraire à une surexpression de Parkin à cet âge pour les éliminer. Pour confirmer que le résultat n'est pas lié à une souris mais qu'il est vraiment lié à la maladie, nous avons réalisé une deuxième analyse par immunoempreinte en utilisant 3 souris supplémentaires de chaque phénotype (Figure 26B). Malgré des niveaux qui peuvent varier selon les souris, la moyenne de Parkin est inchangée entre les souris contrôles et les souris SOD1 (WT :  $0,54 \pm 0,40$ , SOD1 :  $0,53 \pm 0,42$ ,  $n=4$ ). Or, vu la taille des vacuoles de varicosités à cet âge, l'expression de Parkin devrait être très élevée pour éliminer les nombreuses mitochondries endommagées.



**Figure 26 : Analyses par immunoempreinte avec l'âge de Parkin dans la moelle ventrale des souris SOD1. A :** Immunoempreinte (A<sub>1</sub>) et histogramme de quantification et normalisation des bandes par rapport à l'actine, protéine de contrôle de chargement sur gel de migration (A<sub>2</sub>) de l'analyse de 2 souris contrôles et 4 souris SOD1 à différents stades de la maladie. **B :** Immunoempreinte (A<sub>1</sub>) et histogramme de quantification et normalisation des bandes par rapport à l'actine, protéine de contrôle de chargement sur gel de migration (A<sub>2</sub>) de l'analyse de 4 souris de chaque phénotype à P90. Chaque barre de l'histogramme représente la moyenne de l'analyse des 4 souris.

Ces analyses montrent donc une déficience de Parkin légèrement présente à P12 mais efficace, qui s'installe surtout dès P50. Ce résultat est très intéressant puisqu'il peut expliquer pourquoi les vacuoles de varicosité ne sont pas éliminées par l'autophagie.

## 3.5 CONCLUSION

---

Nous avons donc vu que les motoneurones de souris WT et SOD1 possèdent des varicosités sur leurs dendrites, qui se vacuolisent et grossissent avec l'avancée de la maladie. Chaque varicosité contient plusieurs vacuoles, qui se forment à l'origine des mitochondries et avec l'implication du réticulum endoplasmique. Les MAM, à l'interface entre ces deux organites, sont très présentes autour des vacuoles lors de leur formation.

Les mitochondries ne sont pas éliminées par l'autophagie, puisque celle-ci est déficiente dès P50 dans le soma, et inhibée dès P90 dans les dendrites. Malgré une autophagie relativement fonctionnelle à P50 dans les dendrites, c'est surtout la mitophagie qui est déficiente, dès P50, et qui n'élimine pas les mitochondries par défaut de Parkin. Donc la mitophagie serait la cause de l'accumulation des vacuoles de varicosités.



## **4 ÉTUDE DES ENTREES SYNAPTIQUES**

---



## 4.1 INTRODUCTION

---

Pour déterminer si un problème de balance synaptique est la cause de la maladie, nous avons étudié les synapses, par des techniques d'immunohistochimie pour évaluer leur nombre, et des techniques d'électrophysiologie pour évaluer leur activité. Nous avons réalisé toutes ces études en amont des premiers symptômes, notamment avant la première vague de dénervation qui a lieu chez la souris vers P60. Toutes ces études ont donc été réalisées vers P50 (entre 42 et 59 jours).

## 4.2 ETUDE ANATOMIQUE DES SYNAPSES

---

Afin de déterminer si une excitotoxicité provenait d'une modification de la couverture synaptique des motoneurones dans la SLA, nous avons mesuré les densités synaptiques sur le motoneurone. J'ai injecté intracellulairement de la neurobiotine par iontophorèse dans un motoneurone chez 6 souris de chaque

phénotype. J'ai analysé dans chaque motoneurone une très grande longueur de dendrite (WT:  $1256 \pm 216 \mu\text{m}$ , SOD1:  $1310 \pm 610 \mu\text{m}$ ). Une reconstruction d'un motoneurone du Triceps Surae de souris contrôle nous a permis de mesurer la longueur totale dendritique (15 cm). La longueur de dendrite analysée pour chaque motoneurone représente donc environ 9% de la longueur totale dendritique. La densité moyenne de contacts synaptiques obtenue pour chaque motoneurone est ainsi très représentative. Pour l'étude de la couverture synaptique au soma, j'ai augmenté le nombre de somas étudiés grâce à des marquages rétrogrades de cholératoxine (CTb). J'ai réalisé des injections intramusculaires de cholératoxine (CTb) dans les muscles gastrocnémien médial et latéral. La cholératoxine a la propriété de traverser les jonctions neuromusculaires, d'être transportée rétrogradement le long des axones et de marquer les somas des motoneurons. Après 10 jours, pour laisser le temps à la cholératoxine de diffuser, j'ai perfusé les souris et prélevé les moelles épinières.

J'ai marqué par immunohistochimie les transporteurs vésiculaires des synapses :

- inhibitrices GABAergiques et glycinergiques (VGAT)
- excitatrices glutamatergiques de type 1 pour les afférences proprioceptives (VGlut1) et de type 2 pour les interneurons excitateurs et les afférences descendantes (VGlut2).

#### **4.2.1 LA DENSITE DES CONTACTS NE CHANGE PAS SUR LE SOMA**

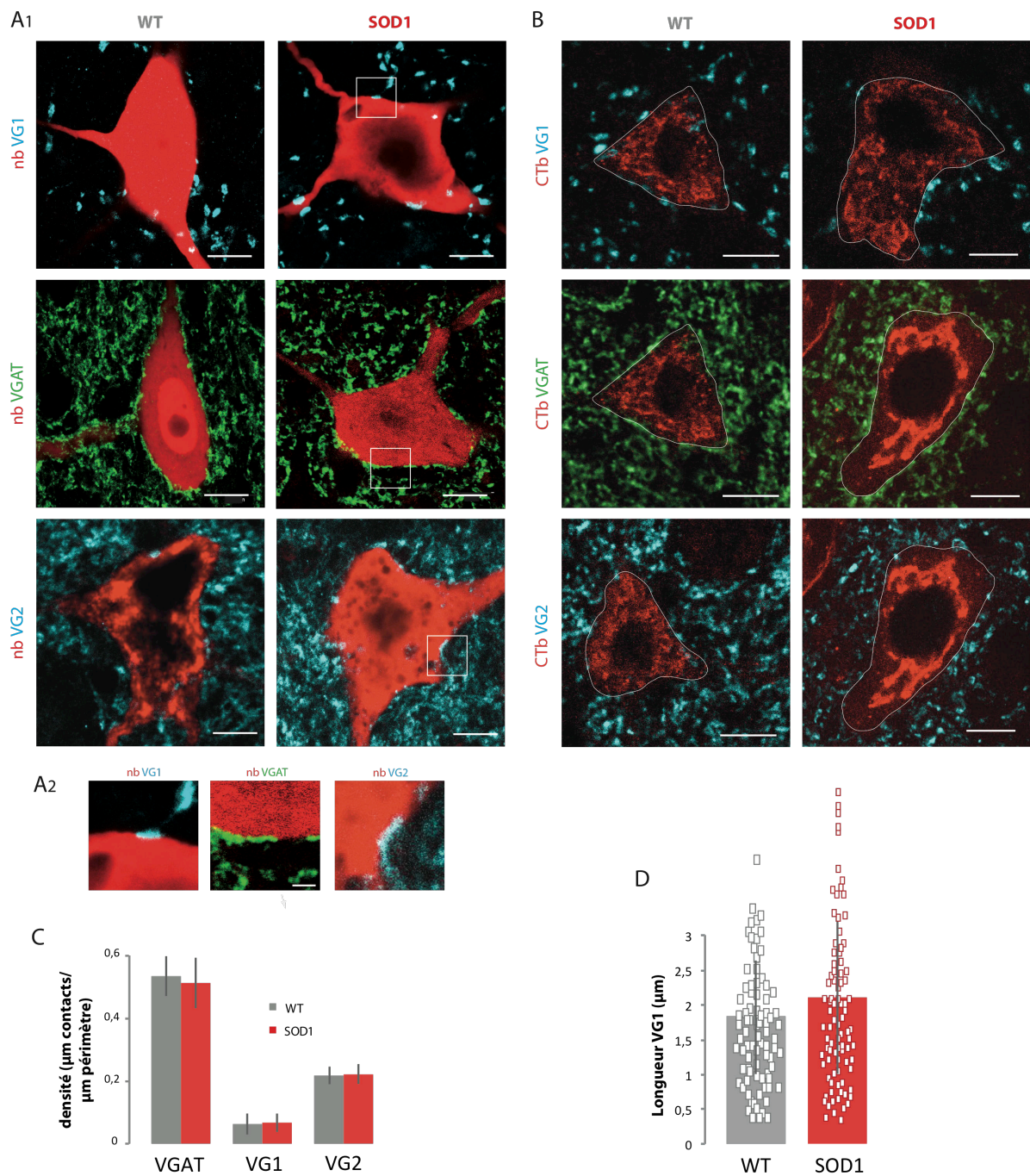
La densité des synapses inhibitrices et des synapses excitatrices de type 2 étant très grande sur le soma, il n'était pas possible de les distinguer individuellement au microscope confocal. Pour mesurer la densité des synapses, j'ai donc mesuré la longueur d'apposition totale de toutes les synapses avec le soma, et divisée celle-ci par le périmètre du soma. La densité synaptique est inchangée par la mutation SOD1 (Figure 27) pour les synapses inhibitrices VGAT (WT :  $0,56 \pm 0,07$ ,  $n=23$  ; SOD1 :  $0,54 \pm 0,09$ ,  $n=23$  ; MW  $p\text{-value}=0,14$ ), excitatrices

VGlut1 (WT :  $0,06 \pm 0,03$ ,  $n=13$  ; SOD1 :  $0,07 \pm 0,03$ ,  $n=13$  ; MW  $p$ -value= $0,35$ ) et excitatrices VGlut2 (WT  $0,23 \pm 0,03$ ,  $n=14$  ; SOD1  $0,23 \pm 0,03$ ,  $n=12$  ; MW  $p$ -value= $0,8$ ). La densité synaptique était très différente selon le type de contact observé. On retrouve les mêmes proportions de synapses dans les souris SOD1 : les synapses inhibitrices sont les plus nombreuses, et les synapses proprioceptives excitatrices (VGlut1) très peu nombreuses (Figure 27B).

A la différence des synapses inhibitrices et des synapses excitatrices de type 2, les synapses VGlut1 sont facilement différenciables les unes des autres, j'ai pu les identifier individuellement et mesurer leur longueur (Figure 27). J'ai mesuré 90 synapses sur trois motoneurones différents pour chaque phénotype. La longueur n'est pas modifiée par la maladie (WT :  $1,84 \pm 0,82 \mu\text{m}$ ,  $n=90$  ; SOD1 :  $2,14 \pm 1,14 \mu\text{m}$ ,  $n=90$  ; MW,  $p$ -value =  $0,1$ ). J'ai représenté chacune des valeurs sur l'histogramme pour visualiser la grande distribution de taille synaptique. Le test statistique utilisé est Mann et Whitney car malgré le nombre élevé de synapses étudiées, la distribution des longueurs de synapses SOD1 ne suit pas une loi normale. On ne peut donc pas faire un test de Student.

Les somas des motoneurones SOD1 reçoivent donc la même densité de synapses inhibitrices et excitatrices que ceux des motoneurones sains, et la taille des synapses VGlut1 n'est pas modifiée. Cependant, la plupart des synapses sont localisées sur l'arborisation dendritique, et non sur le soma des motoneurones<sup>130,131</sup>. J'ai donc mesuré la densité des synapses sur les dendrites.



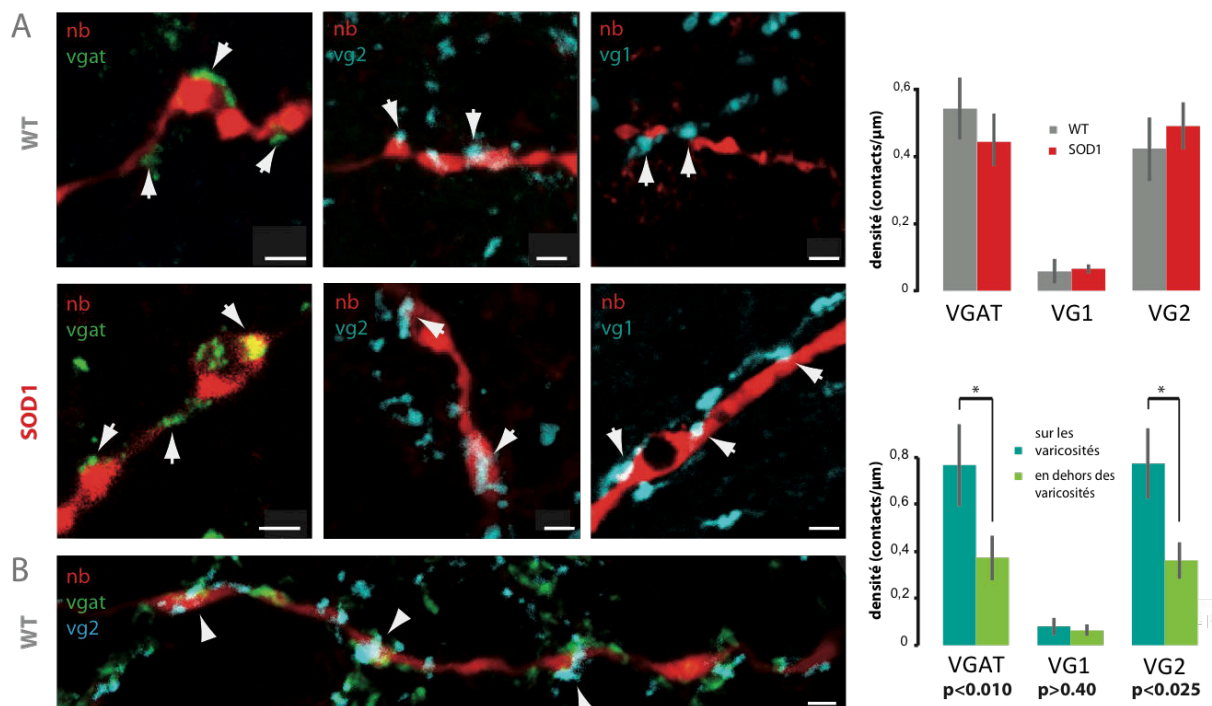


**Figure 27 : Répartition synaptique des synapses inhibitrices et excitatrices de type 1 et 2 sur le soma. A<sub>1</sub> :** Marquage immunohistochimique des synapses inhibitrices (VGAT) et des synapses excitatrices de type 1 VGlut1 (VG1) et de type 2 VGlut2 (VG2) sur des motoneurones marqués intracellulairement à la neurobiotine de souris WT et SOD1. **A<sub>2</sub> :** Agrandissement des carrés en A. On ne distingue qu'une seule synapse VGlut1, mais une succession de synapses VGAT et VGlut2. **B :** Marquage immunohistochimique VGAT-VG1-VG2 sur des motoneurones marqués rétrogradement au CTb pour les souris WT (haut) et SOD1 (bas). Le périmètre du soma (trait blanc) est tracé en augmentant le contraste du CTb. **C :** Histogramme des densités synaptiques des synapses

inhibitrices (VGAT), et excitatrices de type 1 (VG1) et de type 2 (VG2). **D** : Histogramme de la longueur des boutons VG1. A, C : barre = 10  $\mu\text{m}$ , B : barre= 2  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2 PAS DE CHANGEMENT SYNAPTIQUE SUR LES DENDRITES

La Figure 28 illustre la distribution des synapses excitatrices et inhibitrices sur les dendrites de souris contrôles et de souris SOD1. De même que sur le soma, la densité des synapses n'est pas modifiée par la mutation pour les synapses inhibitrices (WT :  $0,54 \pm 0,09$  contacts/ $\mu\text{m}$ , n=5, SOD1 :  $0,45 \pm 0,08$  contacts/ $\mu\text{m}$ , n=6, MW p= 0,20), excitatrices VGlut1 (WT :  $0,06 \pm 0,04$  contacts/ $\mu\text{m}$ , n=6, SOD1 :  $0,07 \pm 0,01$  contacts/ $\mu\text{m}$ , n=6, MW p= 0,51) et excitatrices VGlut2 (WT :  $0,42 \pm 0,09$  contacts/ $\mu\text{m}$ , n=6, SOD1 :  $0,49 \pm 0,07$  contacts/ $\mu\text{m}$ , n=6 ; MW, p=0,38). La répartition est également respectée entre les différents types de synapses : faible proportion de synapses VGlut1 comparée aux synapses VGlut2 et aux synapses inhibitrices.



**Figure 28 : Répartition des synapses inhibitrices et excitatrices sur les dendrites. A** : Dendrites marquées par la neurobiotine (nb) en apposition avec des synapses inhibitrices (vgat), et excitatrices

de type 1 (vg1) et de type 2 (vg2) (flèches). Barre = 2  $\mu\text{m}$ . **B** : Dendrite de motoneurone contrôle sur laquelle les synapses se concentrent sur les varicosités (flèches). Barre = 10  $\mu\text{m}$ .

Le rapport inhibition/excitation est différent au soma et dans les dendrites. On a vu qu'au soma, l'inhibition était plus forte que l'excitation (Figure 27B). Sur les dendrites, les synapses excitatrices VGlut2 sont aussi nombreuses que les synapses inhibitrices. Ainsi le rapport inhibition sur excitation est plus élevé au soma que sur les dendrites. On retrouve ce résultat dans les dendrites de motoneurones de souris contrôles et de souris SOD1.

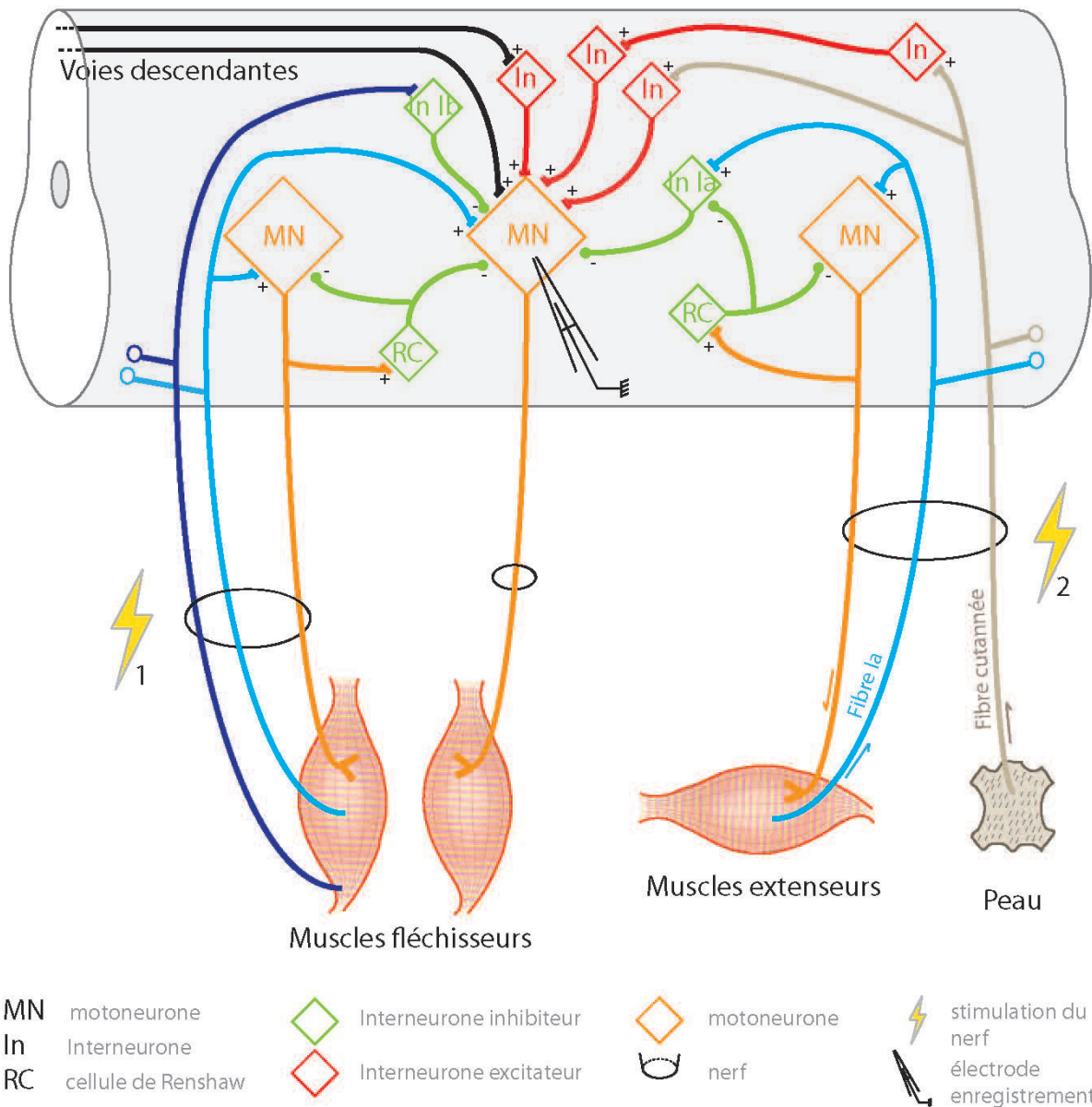
En revanche, nous avons remarqué, comme le montre la Figure 28B, que dans les dendrites, les synapses se positionnent souvent sur les varicosités. Pour vérifier cela, nous avons mesuré la densité synaptique sur les varicosités en comptant le nombre de synapses se trouvant sur les varicosités et en le divisant par la longueur cumulée de varicosités. Nous avons fait de même pour la densité hors varicosité en divisant par la longueur cumulée de dendrite hors varicosité. De manière intéressante, les synapses inhibitrices et les synapses excitatrices VGlut2 se concentrent majoritairement sur les varicosités, et cela aussi bien pour les motoneurones contrôles que les motoneurones SOD1 (Tableau 2). Les synapses excitatrices de type 1 se répartissent de manière égale sur et en dehors des varicosités. Les varicosités correspondent donc à des zones dendritiques à forte concentration synaptique. Or, ce sont justement les varicosités qui se vacuolisent dans les souris SOD1. Donc les zones à forte activité synaptique se vacuolisent. Ce travail nous amène à faire l'hypothèse qu'il existe probablement un lien entre la vacuolisation et l'activité synaptique.

**Tableau 2 : Répartition synaptique sur les varicosités et en dehors des varicosités dans les motoneurones WT et SOD1.**

	WT		SOD1	
	Densité sur varicosités (contacts/ $\mu\text{m}$ )	Densité hors varicosités (contacts/ $\mu\text{m}$ )	Densité sur varicosités (contacts/ $\mu\text{m}$ )	Densité hors varicosités (contacts/ $\mu\text{m}$ )
<b>VGAT</b>	0,87 $\pm$ 0,15	0,42 $\pm$ 0,09 ** p=0,008	0,76 $\pm$ 0,17	0,37 $\pm$ 0,09 *** p=0,002
<b>VGlut1</b>	0,05 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,04 p=0,87	0,08 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,02 p=0,46
<b>VGlut2</b>	0,73 $\pm$ 0,21	0,33 $\pm$ 0,09 *** p=0,002	0,77 $\pm$ 0,15	0,36 $\pm$ 0,08 * p=0,02

## 4.3 ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE DES ENTREES SYNAPTIQUES

Comme ni le nombre ni la taille des synapses ne sont modifiés à P50 sur les motoneurones SOD1, un changement d'excitation extrinsèque ne pourrait provenir que de l'activité des synapses. Avec un même nombre de synapses, l'excitabilité des interneurones pré-moteurs peut évoluer avec la maladie, tout comme l'efficacité de la transmission synaptique. Un changement de balance synaptique peut donc être imputé au circuit, ou aux éléments pré-synaptiques ou post-synaptiques des synapses excitatrices et/ou inhibitrices. Une méthode pour tester la voie dans son ensemble est de stimuler un circuit pré-moteur excitateur ou inhibiteur et d'enregistrer sa réponse au soma du motoneurone sur lequel il se projette (Figure 29).



**Figure 29 : Représentation schématique de quelques circuits pré-moteurs de deux groupes de muscles antagonistes.**

En stimulant un nerf de muscle agoniste (1), on active les fibres Ia proprioceptives qui se projettent de façon monosynaptique sur les motoneurons agonistes, dont le motoneurone que l'on enregistre, et les fibres Ib qui excitent de façon disynaptique ces motoneurons. On recrute également l'axone des motoneurons. Un potentiel d'action remonte de manière antidromique, se projette sur un interneurone inhibiteur : la cellule de Renshaw, qui inhibe par une boucle de rétrocontrôle négatif le motoneurone excité et les motoneurons des muscles agonistes (inhibition récurrente). En stimulant un nerf de muscle antagoniste (2), on recrute à bas seuil les fibres Ia qui se projettent sur un interneurone Ia qui inhibe le motoneurone enregistré (inhibition réciproque). A stimulation légèrement plus forte, les fibres cutanées sont recrutées, qui peuvent se projeter de manière di- ou trisynaptique sur les motoneurons antagonistes.



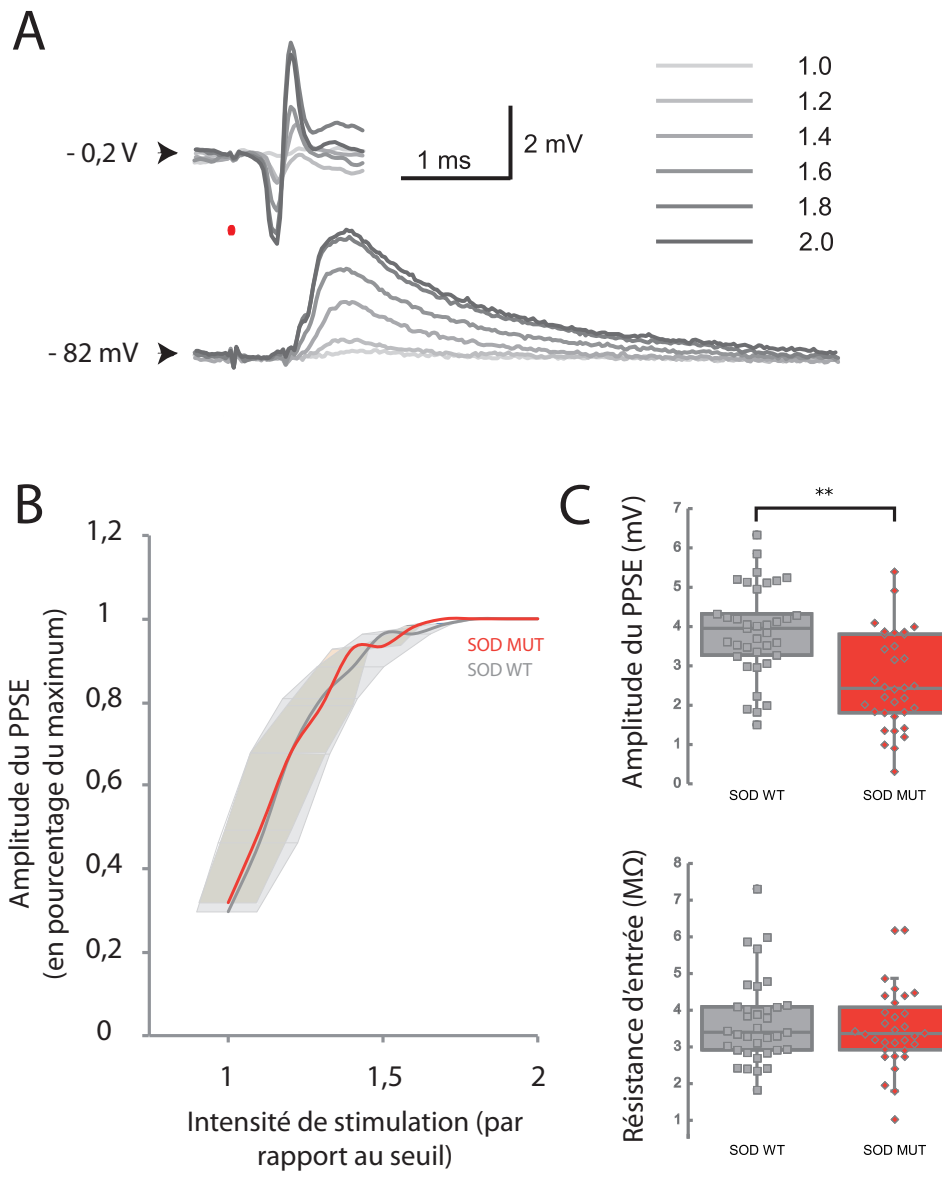
Pour étudier l'activité des synapses excitatrices et inhibitrices, nous avons utilisé des souris SOD1 que nous avons comparées à des souris non transgéniques ou à des souris transgéniques portant le gène humain SOD1 non muté (SODWT).

### **4.3.1 DIMINUTION DE L'EXCITATION DANS LES SOURIS SOD1**

#### **4.3.1.1 AMPLITUDE DES PPSE IA DIMINUEE PAR LA MUTATION**

Le circuit le plus simple à tester, car monosynaptique, est le circuit qui part des fibres sensorielles Ia, issues des fuseaux neuromusculaires, et qui établissent des synapses excitatrices avec les motoneurones des muscles agonistes. Les afférences Ia transmettent aux motoneurones des informations sur les changements de longueur du muscle détectés par les terminaisons primaires des fuseaux neuromusculaires. Dans nos conditions expérimentales, les fibres Ia peuvent être recrutées par un bref choc électrique de faible intensité du nerf. Ce choqe recrute également les fibres Ib mais elles ne se projettent pas de manière monosynaptique sur le motoneurone. A environ deux fois le seuil (c'est-à-dire deux fois l'intensité minimale de stimulation pour obtenir une réponse enregistrée par l'électrode de volée), toutes les fibres Ia sont recrutées. Pour étudier le circuit monosynaptique Ia, nous avons enregistré intracellulairement des motoneurones du Triceps Suræ. Pendant l'enregistrement, nous avons stimulé le nerf du Triceps Suræ à faible intensité. Ainsi les fibres Ia excitées projetaient sur les motoneurones du TS, dont celui que nous enregistrons, de manière monosynaptique. La Figure 30A illustre l'enregistrement d'un motoneurone. La volée et le PPSE grossissent simultanément avec l'augmentation de la stimulation. Pour atteindre l'amplitude maximale du PPSE, nous avons ajouté du QX314 dans l'électrode qui bloque les canaux sodiques, donc bloque les potentiels d'action. L'amplitude maximale est atteinte pour une même stimulation moyenne chez les souris SODWT et les souris SOD1 :  $1,44 \pm 0,15$  fois le seuil pour les motoneurones de souris SODWT (n=29), et  $1,51 \pm 0,16$  fois le seuil pour les motoneurones de souris SOD1 (n=20). La courbe de recrutement de la

Figure 30B illustre ces données. L'accroissement progressif de l'amplitude des PPSE est du au recrutement progressif des fibres Ia. Juste au dessus du seuil, seules les fibres de très gros diamètre sont recrutées. Le signal est intégré en un petit PPSE. A plus forte intensité, des fibres Ia de diamètre moyen sont également recrutées. Il y a donc plus de fibres qui libèrent des neurotransmetteurs sur le motoneurone, les PPSE somatiques et dendritiques en résultant se somment au soma pour former un plus grand PPSE. Enfin, à environ 2 fois le seuil, toutes les fibres sont recrutées, libérant tous les neurotransmetteurs des fibres Ia et formant un PPSE d'amplitude maximale au soma du motoneurone.



**Figure 30 :**  
**Gradation des**  
**PPSE et courbe**  
**de recrutement**  
**des fibres Ia. A :**

Enregistrements de la volée afférente et du motoneurone lors de stimulations du nerf du TS à des intensités variant de 1 à 2 fois le seuil. La stimulation est marquée par le point rouge. **B.** Courbe de recrutement des fibres Ia. Les aires représentent les écarts types. **C :** Comparaison de

l'amplitude et de la résistance d'entrée des motoneurons SOD Mut et des motoneurons SOD WT.

La courbe de recrutement des fibres Ia n'est pas modifiée, ce qui signifie que les fibres Ia ont une même excitabilité chez les souris SODWT et les souris SOD1. En revanche, pour savoir si la transmission synaptique est modifiée, nous avons mesuré les amplitudes maximales des PPSE. L'élément pré ou post synaptique peut en effet modifier l'amplitude du PPSE enregistré dans le motoneurone, indépendamment de l'excitabilité des fibres afférentes. Il est intéressant de constater que l'amplitude des PPSE est plus faible dans les motoneurones SOD1 (Figure 30C) (SOD WT :  $3,87 \pm 1,14$  mV, n=37 ; SOD MUT :  $2,60 \pm 1,21$  mV, n=34 ; test de Student, p-value=0,00002). Pour vérifier que la baisse de l'amplitude n'est pas liée à une baisse de la conductance des motoneurones SOD MUT, nous avons mesuré la résistance d'entrée des motoneurones SOD MUT et SOD WT (Figure 30C). La résistance est inchangée par la mutation (SOD WT :  $3,69 \pm 1,17$  M $\Omega$ , n=35 ; SOD MUT :  $3,50 \pm 1,09$  M $\Omega$ , n=32 ; MW, p-value=0,79). De même les potentiels de membrane de repos (SOD WT :  $-70 \pm 6$  mV ; SOD MUT :  $-66 \pm 6$  mV) et les constantes de temps membranaires (SOD WT :  $3,2 \pm 1,5$  ms ; SOD MUT :  $3,4 \pm 1,2$  ms) sont inchangés.

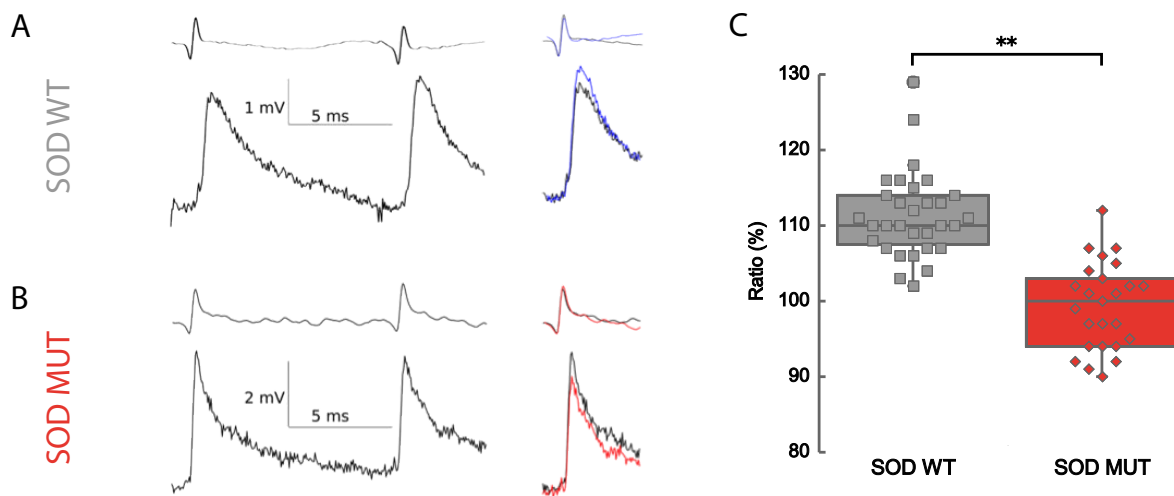
#### 4.3.1.2 UNE DEPRESSION DU SIGNAL D'ORIGINE SYNAPTIQUE

Une méthode pour étudier si la synapse est défaillante est de réaliser des doubles stimulations à haute fréquence (stimulations appariées). En effet, cette double stimulation recrute les mêmes synapses deux fois de suite. On peut comparer les deux réponses, qui peuvent évoluer l'une par rapport à l'autre, par exemple par le nombre de vésicules de neurotransmetteurs libérées, ou par une désensibilisation des récepteurs post-synaptiques.

Pour cela, nous avons placé une électrode de stimulation sur le nerf du TS. Lors de l'enregistrement d'un motoneurone, nous avons stimulé deux fois le nerf à des temps rapprochés : 10 ms. Cette stimulation produit deux PPSE dans le motoneurone qui se suivent (Figure 31A). Nous avons mesuré l'amplitude du 2<sup>e</sup> PPSE en comparaison avec le 1<sup>er</sup> PPSE. Dans les exemples illustrés, il est légèrement plus grand (Figure 31A, superposition des courbes) pour le motoneurone WT. En revanche, il apparaît plus petit chez les souris SOD1 mutées



(Figure 31B). Pour quantifier la différence entre souris contrôles et souris mutées, nous avons pour chaque motoneurone calculé le ratio de la taille du 2<sup>e</sup> PPSE sur la taille du 1<sup>er</sup> PPSE (en moyennant plusieurs enregistrements), sur 31 motoneurones contrôles et 25 motoneurones SOD1 (Figure 31C). Le ratio est plus petit chez les souris SOD1 (SOD WT :  $1,11 \pm 0,06$  mV,  $n=31$  ; SOD MUT :  $0,99 \pm 0,06$  mV,  $n=25$  ; test de Student,  $p\text{-value} < 0,0001$ ). Il est intéressant de remarquer que la diminution du 2<sup>e</sup> PPSE dans plusieurs motoneurones SOD1 montre une dépression dans ces motoneurones, ce qui n'est jamais observé chez les souris contrôles (Figure 31C). Les souris contrôles montrent pour la plupart une facilitation. Il y a donc une perte de la facilitation liée aux stimulations appariées dans les motoneurones SOD1. Ces résultats montrent une défaillance d'origine synaptique des motoneurones de souris SOD1.

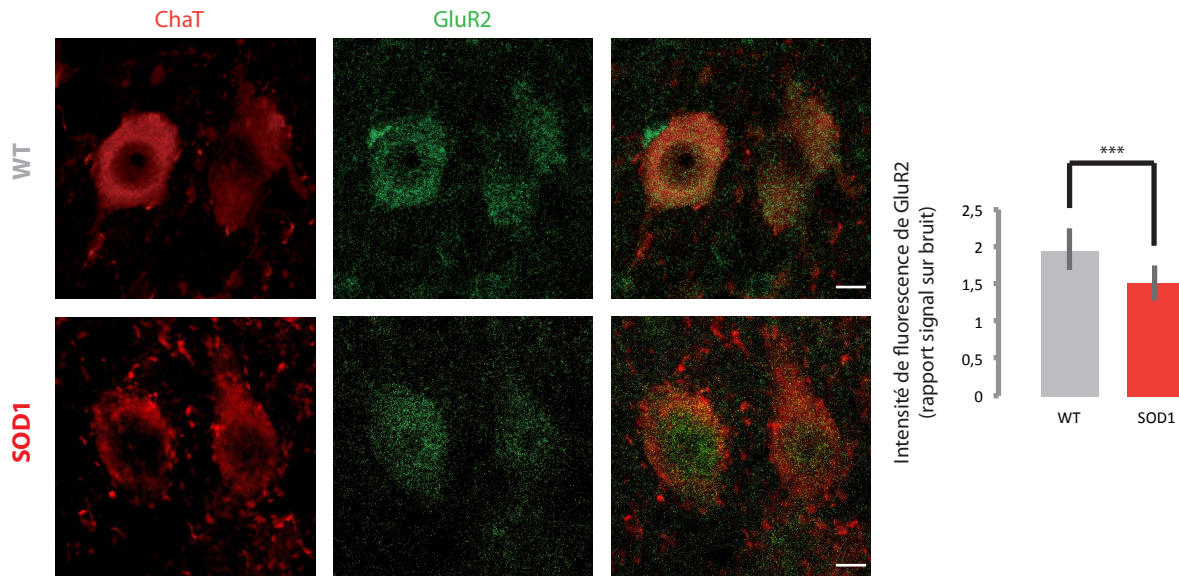


**Figure 31 : Double stimulation à haute fréquence des afférences Ia.** **A** : Facilitation dans les souris contrôles : le 2<sup>e</sup> PPSE (en bleu dans la superposition) est plus grand. **B** : Dépression dans les souris SOD MUT : le 2<sup>e</sup> PPSE (en rouge dans la superposition) est plus petit que le 1<sup>er</sup>. Dans chaque exemple, la trace du haut représente la volée afférente, la trace du bas la réponse du motoneurone. **C** : Quantification de la différence : ratio de la taille du 2<sup>e</sup> PPSE sur le 1<sup>er</sup>.

Pour déterminer si la synapse est défaillante au niveau de l'élément post-synaptique, nous avons quantifié les sous-unités GluR2 (une des sous-unités des récepteurs AMPA). GluR2 est une sous-unité particulière puisque c'est sa présence qui rend le canal imperméable au calcium. Les motoneurones sont sensibles à l'excitotoxicité puisqu'ils possèdent naturellement peu de sous-unités GluR2<sup>142</sup>.

Par immunohistochimie, nous avons marqué les motoneurones (ChaT) et les récepteurs AMPA (GluR2). Après acquisition au confocal des tranches contenant les motoneurones marqués par ChaT avec les mêmes paramètres d'acquisition, j'ai pour chaque motoneurone, quantifié par ImageJ la luminescence du marquage GluR2 dans le motoneurone, en moyennant la luminescence de tous les pixels d'un motoneurone. J'ai ensuite quantifié la luminescence du bruit, en moyennant les pixels en dehors du motoneurone. En divisant la luminescence du motoneurone par la luminescence du bruit, j'ai ainsi obtenu le signal rapport/bruit. On remarque d'après la Figure 32 une diminution de 22% du rapport signal/bruit de GluR2 dans les motoneurones SOD1 par rapport aux motoneurones contrôles (WT :  $1,96 \pm 0,29$ ,  $n=30$  ; SOD1 :  $1,53 \pm 0,24$ ,  $n=30$ , MW,  $p$ -value < 0,001). Dès lors, les motoneurones possèdent moins de sous-unités GluR2 dans leur cytoplasme. Cette baisse de sous-unités montre qu'il pourrait y avoir une baisse de la quantité des récepteurs AMPA, et/ou un changement du type de sous-unités constituant ces récepteurs. Dans le premier cas, une baisse des récepteurs AMPA à la membrane expliquerait la diminution de l'amplitude des PPSE.

La diminution de la taille des PPSE Ia n'est pas due à une réduction de la densité des boutons synaptiques VGlut1. Elle est due à une défaillance synaptique qui pourrait être, en partie, d'origine post-synaptique.



**Figure 32 : Diminution des sous-unités GluR2 des récepteurs AMPA dans les souris SOD1.** Co-marquage de motoneurones (ChaT) et des sous-unités GluR2 des récepteurs AMPA dans les souris WT et SOD1. A droite, quantification de la luminescence de GluR2. Les valeurs représentées sont des ratios : la luminescence est mesurée sur ImageJ dans les motoneurones, puis divisée par la luminescence du bruit.

Les motoneurones reçoivent moins d'excitation, car la taille maximale des PPSE est diminuée chez les souris SOD1. Ce résultat ne peut pas être dû à une diminution du nombre ou de la taille des synapses puisque nous avons vu que le nombre est inchangé à P50. Ce n'est pas non plus une baisse de l'excitabilité des fibres Ia. Les propriétés passives sont inchangées, donc elles ne sont pas non plus la cause de la diminution du PPSE. Le test de stimulations appariées montre en revanche que la cause de la diminution des PPSE est d'origine synaptique. Le manque de sous-unités GluR2 dans le cytoplasme des motoneurones suggère que le nombre ou la structure des récepteurs AMPA à la membrane pourrait être diminués.

Ce résultat va à l'encontre de l'hypothèse de départ qui était qu'une excitotoxicité pourrait être causée par une hyperexcitation. Cependant l'excitation que reçoit le motoneurone est contrôlée également par la quantité d'inhibition qu'il reçoit.

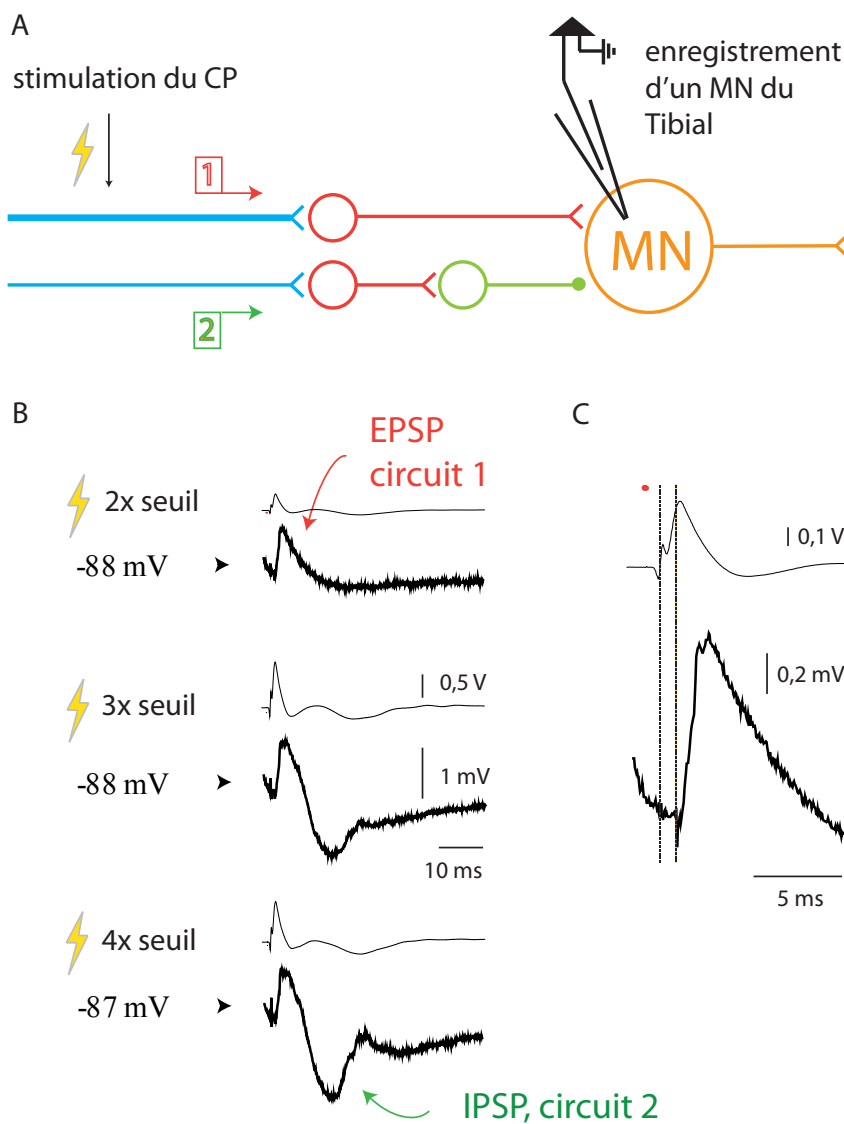
### 4.3.2 DIMINUTION DE L'INHIBITION DANS LES MOTONEURONES DE SOURIS SOD1

Pour évaluer l'excitabilité des circuits inhibiteurs, nous nous sommes intéressés à un couple de nerfs : le nerf du Sciatique Poplité Interne (SPI) et le nerf du Péronier Commun (CP). Ces deux nerfs innervent respectivement, entre autres, les muscles Gastrocnémiens et le Soléaire d'une part, muscles extenseurs de la cheville, et le Tibialis Anterior, Peroneus Longus et l'Extenseur Long des Doigts d'autre part, muscles fléchisseurs de la cheville. Comme ces muscles sont antagonistes, leurs motoneurones communiquent entre eux par des circuits impliquant de l'inhibition, pour éviter des contractions simultanées des deux groupes de muscles et permettre le mouvement. L'étude de ces deux nerfs permet donc d'étudier des inhibitions. Plusieurs circuits peuvent être impliqués, comme l'inhibition réciproque, ou l'inhibition récurrente qui réduit l'inhibition réciproque (Figure 29). Pour les activer, nous avons enregistré des motoneurones innervés par le nerf SCI (motoneurones dont l'axone est stimulé dans le nerf SCI), pendant que nous avons stimulé le nerf du CP. Nous avons ainsi activé les circuits dont les motoneurones du CP et les fibres afférentes du CP projettent de manière indirecte sur les motoneurones du SCI. Le nerf du CP contient également des fibres cutanées dont certaines peuvent activer des circuits se projetant sur les motoneurones du SCI. Nous n'avons pas cherché dans cette expérience à identifier les différents circuits, mais à étudier l'effet inhibiteur net. Nous avons réalisé cette étude sur 16 motoneurones du SCI de souris contrôles (non transgéniques) et 13 motoneurones du SCI de souris SOD1<sup>G93A</sup>.

#### 4.3.2.1 VARIATIONS DES REPONSES ENREGISTREES SELON L'INTENSITE DE STIMULATION APPLIQUEE

Les potentiels de membrane excitateurs et inhibiteurs (PPSE et PPSI) des motoneurones du SCI varient selon l'intensité de la stimulation appliquée au nerf du CP. En effet, les fibres afférentes des différents récepteurs musculaires et cutanés ont des diamètres différents, ce qui les rend plus ou moins excitables. A

faible intensité de stimulation (2 fois le seuil), seules les fibres musculaires du groupe I (Ia et Ib) de plus gros diamètre ainsi que les fibres cutanées les plus grosses sont recrutées (Figure 29). Dans l'exemple de la Figure 33, cette stimulation induit un PPSE. J'ai pu mesurer cette latence en mesurant le temps entre le moment où la courbe de la volée recroise la valeur de repos et le début du PPSE (Figure 33C). Ici la latence est de 1,1ms, suggérant que le circuit recruté est disynaptique (cette latence ne laisse le temps d'activer qu'un seul interneurone relai).



interneurone relai).

Mais à une stimulation plus forte, d'autres fibres afférentes sont stimulées, recrutant alors d'autres circuits. Le motoneurone émet alors dans cet exemple un PPSI. Ce PPSI est dû au fait que les fibres afférentes nouvellement recrutées se projettent sur un interneurone inhibiteur. La latence du PPSI, plus longue que la latence du PPSE, car il apparaît après le PPSE, suggère que le 2<sup>e</sup> circuit est trisynaptique.

**Figure 33 : Réponse du motoneurone dépendante de l'intensité de stimulation du nerf. A :** Schéma d'un exemple de deux circuits projetant sur le motoneurone et l'activant suite à la stimulation du nerf du CP. Les fibres afférentes (bleu) sont stimulées par une électrode. Elles projettent sur des interneurons excitateurs (rouge) qui projettent soit directement sur le

motoneurone, soit sur un interneurone inhibiteur (vert). Chaque fibre et chaque interneurone du schéma représentent en réalité une population dont suffisamment de membres doivent être recrutés pour que le MN émette une réponse. **B** : Enregistrement du potentiel de membrane du motoneurone à différentes intensités de stimulation. A 2 fois le seuil de stimulation, le motoneurone émet un PPSE. A 3 fois le seuil apparaît un PPSI. Pour chaque intensité, la courbe du haut représente la volée, la courbe du bas le motoneurone. **C** : Agrandissement du PPSE à 2 fois le seuil pour mesurer la latence du PPSE, il est disynaptique. Point rouge : stimulation. Haut : volée, bas : motoneurone.

Ainsi, plusieurs circuits étant impliqués, différentes intensités de stimulation font apparaître différents événements dans le motoneurone. Les réponses varient selon les motoneurones étudiés et les circuits stimulés.

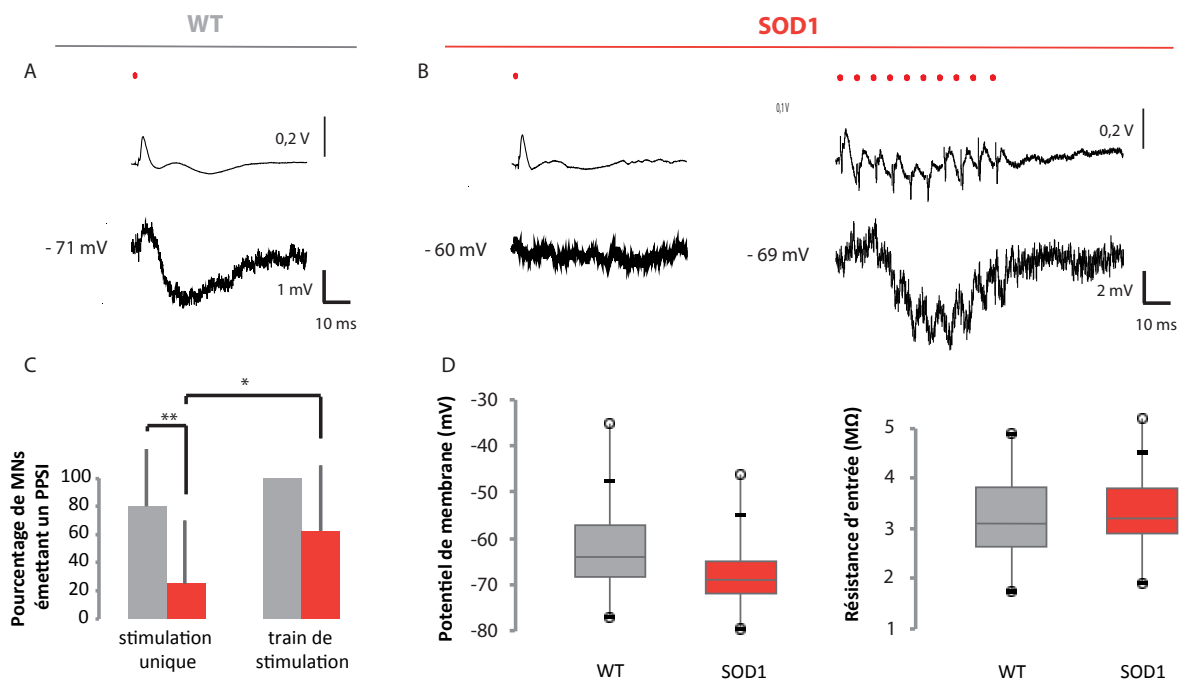
#### 4.3.2.2 DIMINUTION DU NOMBRE DE PPSI DANS LES SOURIS SOD1

La première analyse de ces expériences montre que les motoneurones du nerf SCI de souris non pathologiques présentent des PPSI en réponse à la stimulation du nerf CP (Figure 34A). Cependant, les motoneurones de souris SOD1 ne présentent pas tous des PPSI. Certains motoneurones, même avec une intensité de stimulation très forte (vingt fois le seuil), intensité qui recrute ainsi toutes les fibres Ia, Ib, II et III (qui relaient de nombreuses modalités sensorielles - proprioception, nociception, thermorégulation, chémoréception...) ne montrent pas de PPSI (Figure 34B). J'ai donc dénombré les motoneurones qui, pour une intensité de stimulation variant entre 1 et 20 fois le seuil, émettaient au moins une fois un PPSI, chez les souris WT et les souris SOD1. Pour les motoneurones du SCI des souris WT, la stimulation du nerf du CP donnait dans 80% des cas un PPSI ( $80\% \pm 41\%$ ,  $n=16$ ). On observe une baisse de ce nombre chez les souris SOD1 : seuls 25% émettent un PPSI ( $25\% \pm 45\%$ ,  $n=12$  ; MW,  $p\text{-value}=0,005$ ).

J'ai vérifié que le manque des PPSI des souris SOD1 n'était pas du à une inhibition *shuntante*. Ces synapses ont une propriété particulière : leur potentiel d'inversion est égal au potentiel de repos du motoneurone. Ainsi au potentiel de repos, les ions chlore ne circulent pas, il n'y a pas de PPSI. Quand la membrane plasmique est dépolarisée, le gradient électrochimique du chlore augmente,

créant un PPSI. J'ai donc dépolarisé les motoneurones, mais il n'y avait toujours pas de PPSI.

L'absence de PPSI peut donc être due au fait que les interneurons pré-moteurs ne déchargeaient pas. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons stimulé le nerf du CP avec un train de stimulation à haute fréquence (200Hz), avec des intensités de stimulation variant de la même façon de 1 à 20 fois le seuil. Le train de stimulation à haute fréquence facilite la sommation des PPSE dans les interneurons, les aidant à atteindre le seuil de décharge d'un potentiel d'action.



**Figure 34 : Les motoneurones SOD1 émettent moins de PPSI. A :** Emission d'un PPSI dans un motoneurone du SCI d'une souris WT suite à une stimulation unique du nerf du CP. **B :** Pas de PPSI dans un motoneurone du SCI d'une souris SOD1 suite à une stimulation unique du nerf du CP (gauche), mais PPSI suite à un train de stimulation (droite). Noter que le fait de voir des PPSI au cours du train de stimulation montre que les enregistrements ne sont pas faits au potentiel d'inversion de la synapse. Les points rouges représentent les stimulations. En A et B, traces du haut : volée afférente, traces du bas : motoneurone. **C :** Quantification du pourcentage de motoneurones émettant un PPSI quelle que soit l'intensité de stimulation, après une stimulation unique ou un train de stimulation. **D :** La baisse du nombre de motoneurones du SCI émettant un PPSI après une stimulation du CP dans les souris SOD1 n'est pas due à un changement du potentiel de membrane ou de la résistance d'entrée dans les souris SOD1.

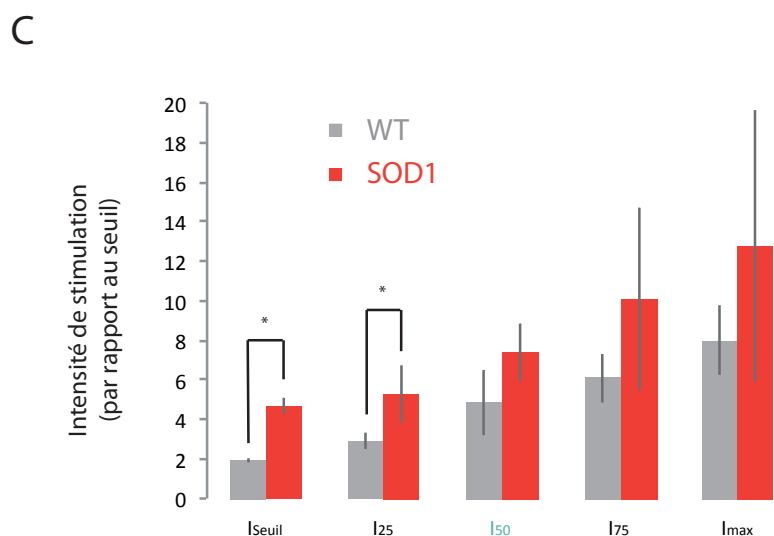
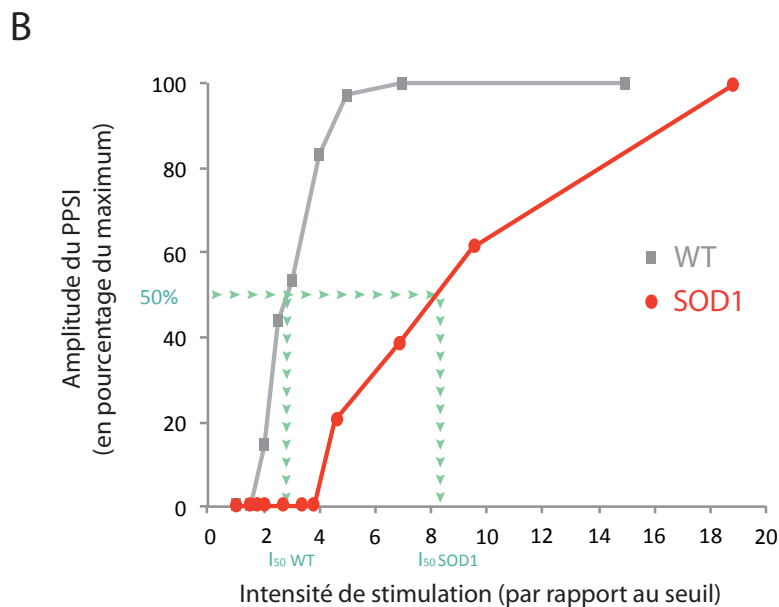
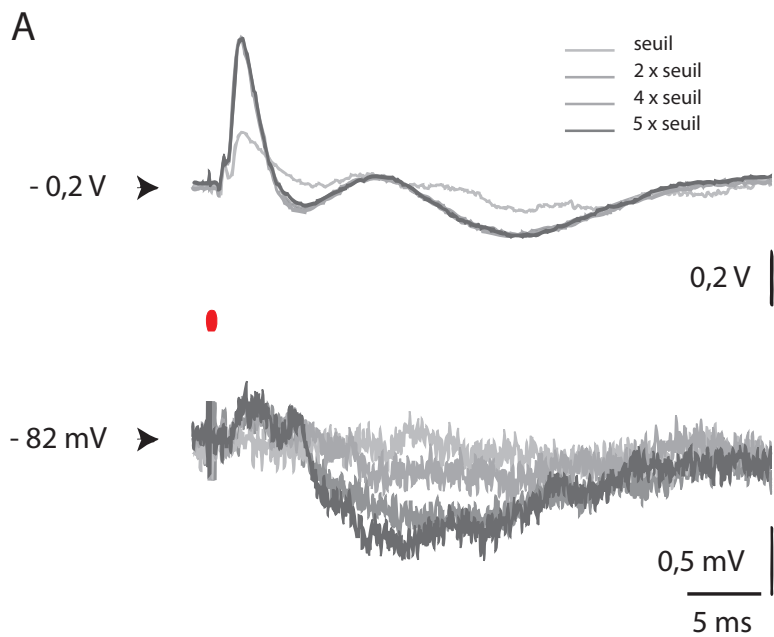
Celui-ci peut alors être conduit le long de l'axone et libérer des neurotransmetteurs à la synapse sur le motoneurone. Le train de stimulation génère ainsi une facilitation temporelle. De façon intéressante, dans les motoneurones SOD1, la proportion de motoneurones émettant un PPSI est augmentée (SOD1 stimulation unique :  $25\pm 45\%$ ,  $n=12$  ; SOD1 train de stimulation :  $63\pm 47\%$ ,  $n=11$  ; MW,  $p\text{-value}=0,01$ ) (Figure 34B et C). Cette augmentation est telle que la proportion de motoneurones qui émettent un PPSI dans les souris SOD1 lors d'un train de stimulation est équivalente à celle des souris WT avec une stimulation unique (WT stimulation unique :  $80\pm 41\%$ ,  $n=16$  ; SOD1 train de stimulation :  $63\pm 47\%$ ,  $n=11$  ; MW,  $p\text{-value}=0,7$ ). Donc les interneurones inhibiteurs des souris SOD1 nécessitent une facilitation temporelle afin d'être recrutés de manière équivalente au recrutement des interneurones de souris contrôles. De même que précédemment, nous avons vérifié que la mutation n'affectait pas les PPSI à travers un changement de potentiel membranaire de repos (WT :  $-61,77\pm 10,50\text{mV}$ ,  $n=16$  ; SOD1 :  $-66,96\pm 8,86\text{mV}$ ,  $n=13$  ; MW,  $p\text{-value}=0,13$ ) ou une modification de la résistance d'entrée (WT :  $3,20\pm 0,92\text{M}\Omega$ ,  $n=16$  ; SOD1 :  $3,42\pm 0,89\text{M}\Omega$ ,  $n=13$  ; MW,  $p\text{-value}=2,9$ ) des motoneurones (Figure 34D).

#### 4.3.2.3 HYPOEXCITABILITE DES INTERNEURONES INHIBITEURS

Pour définir si l'absence de PPSI dans les motoneurones SOD1 vient d'un recrutement moins efficace des interneurones inhibiteurs, nous avons tracé les courbes de recrutement des effets inhibiteurs. Cette courbe de recrutement correspond au recrutement progressif des fibres afférentes, et des interneurones sur lesquels elles projettent, avec l'intensité croissante de la stimulation. L'amplitude du PPSI au soma reflète indirectement le recrutement des interneurones inhibiteurs. En effet, plus le nombre des interneurones recrutés sera grand, plus les PPSI reçus sur les dendrites du motoneurone seront nombreux et vont se sommer au niveau du soma. Donc pour mesurer l'excitabilité des circuits inhibiteurs, nous avons mesuré l'amplitude du PPSI à différentes



intensités de stimulation. Dans un train de stimulation, l'amplitude des PPSI se somme, donc il a fallu réaliser cette étude en stimulant avec un choc unique. Or on a vu plus haut que très peu de motoneurones SOD1 produisaient un PPSI suite à une stimulation en choc unique. C'est pour cette raison que j'ai analysé uniquement 4 motoneurones dans cette étude. La Figure 35A montre un exemple d'accroissement du PPSI avec l'intensité de la stimulation, dans un motoneurone WT. Au seuil, il n'y a pas de PPSI. Celui-ci apparaît en augmentant la stimulation à deux fois le seuil. L'amplitude s'accroît à trois fois le seuil pour atteindre son maximum à cinq fois le seuil. Nous avons pu tracer la courbe de recrutement correspondante pour chaque motoneurone (Figure 35B). On peut observer que dans les souris SOD1, la courbe de recrutement est décalée vers la droite, l'intensité de stimulation nécessaire pour obtenir une même amplitude de PPSI est plus grande. Pour quantifier ce changement, j'ai relevé sur chaque courbe 5 valeurs : l'intensité de stimulation seuil nécessaire pour obtenir un PPSI ( $I_{\text{seuil}}$ ), l'intensité de stimulation pour obtenir un PPSI dont l'amplitude est maximale ( $I_{\text{max}}$ ), et les intensités de stimulation pour obtenir 25, 50 et 75% ( $I_{25}$ ,  $I_{50}$ ,  $I_{75}$ ) de la valeur maximale du PPSI. La Figure 35C illustre la quantification de ces 5 points. Les PPSI sont générés par plusieurs circuits différents, ce qui explique les écarts types importants. De plus, le faible nombre de PPSI observés dans les souris SOD1 rend leur étude et leur quantification difficile. Dans les motoneurones WT, il faut une intensité de stimulation d'un peu moins de 2 fois le seuil pour obtenir un PPSI, ce qui est supérieur à l'intensité de stimulation nécessaire à l'obtention d'un PPSE monosynaptique par la stimulation des fibres Ia. Ceci s'explique par le fait que les circuits inhibiteurs sont au moins disynaptiques, donc comprennent au moins un interneurone. Il faut activer suffisamment cet interneurone pour qu'il émette un potentiel d'action et libère à son tour des neurotransmetteurs.



**Figure 35 : Courbe de recrutement des interneurones inhibiteurs.**

**A.** Enregistrements de la volée (en haut) et du motoneurone (en bas) à des stimulations au seuil, 2x le seuil, 4x le seuil et 5x le seuil. La stimulation est marquée par le point rouge. **B.** Courbe de recrutement du circuit inhibiteur du motoneurone WT étudié en A, et courbe de recrutement d'un motoneurone SOD1. En vert:  $I_{50}$ , une des 5 valeurs lues sur la courbe pour la quantification:  $I_{seuil}$ ,  $I_{25}$ ,  $I_{50}$ ,  $I_{75}$  et  $I_{max}$ .

A cause du faible nombre de motoneurones étudiés et de la grande variété de circuits inhibiteurs stimulés, les écarts-types sont très importants. La différence est significative pour l'intensité de stimulation seuil pour obtenir un PPSI (WT :  $1,9 \pm 0,1$  fois le seuil,  $n=4$ ; SOD1 :  $4,5 \pm 0,4$  fois le seuil,  $n=4$ , MW,  $p\text{-value}=0,03$ ) et pour  $I_{25}$  (WT :  $2,8 \pm 0,4$  fois le seuil,  $n=4$ ; SOD1 :  $5,1 \pm 1,4$  fois le seuil,  $n=4$ , MW,  $p\text{-value}=0,03$ ). Pour les valeurs

suivantes, les tests statistiques ne montrent pas de différence significative ( $I_{50}$  WT :  $4,7 \pm 1,6$  fois le seuil,  $n=4$  ; SOD1 :  $7,1 \pm 1,4$  fois le seuil,  $n=4$ , MW,  $p$ -value=0,1 ;  $I_{75}$  WT :  $5,9 \pm 1,2$  fois le seuil,  $n=4$  ; SOD1 :  $9,7 \pm 4,4$  fois le seuil,  $n=4$ , MW,  $p$ -value=0,2 ;  $I_{max}$  WT :  $7,7 \pm 1,7$  fois le seuil,  $n=4$  ; SOD1 :  $12,3 \pm 6,6$  fois le seuil,  $n=4$ , MW,  $p$ -value=0,1). Le fait que l'intensité seuil pour recruter les interneurons a augmenté suggère que les interneurons inhibiteurs sont moins excités ou moins excitables dans les souris mutantes que dans les souris contrôles.

Nous avons voulu étudier les circuits séparément. Pour cela, nous nous sommes intéressés à deux groupes de motoneurons dont, chez le chat, l'existence de l'inhibition réciproque a été prouvée<sup>143</sup>. Il s'agit des motoneurons innervant le Quadriceps et des motoneurons innervant le PBST. Malheureusement, de nombreux problèmes techniques liés à la difficulté de l'expérience ne m'ont pas permis de récolter de données pour le moment.

Cette étude préliminaire suggère néanmoins une baisse de l'efficacité des circuits inhibiteurs, qui proviendrait en partie de la baisse de l'excitabilité des interneurons inhibiteurs eux-mêmes.

## 4.4 CONCLUSION

---

Nous avons vu que le nombre des synapses excitatrices et inhibitrices était inchangé autour de P50, avant le début des dénervations musculaires, sur le soma et sur l'arborisation dendritique. L'efficacité des circuits spinaux semble en revanche modifiée. Notre travail montre une diminution d'efficacité des synapses Ia-motoneurons. Nous avons vu que GluR2 était moins présente chez les souris SOD1. Ce résultat peut signifier qu'il y a moins de récepteurs AMPA présents aux synapses excitatrices expliquant la réduction d'efficacité des synapses excitatrices. Une diminution de la contribution des sous-unités GluR2 aux récepteurs AMPA, pourrait rendre ces récepteurs plus perméables au calcium. De

façon paradoxale, plus de calcium pourrait rentrer dans le motoneurone malgré la réduction de taille du PPSE.

Nos résultats préliminaires suggèrent que les circuits inhibiteurs sont moins efficaces probablement à cause d'une baisse de l'excitabilité des interneurons inhibiteurs. Si cette hypoexcitabilité des interneurons était confirmée, on devrait se demander si elle pourrait être due à une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique entre les afférences proprioceptives ou cutanées et les interneurons inhibiteurs.

Enfin, nous avons vu que les synapses inhibitrices et excitatrices de type 2 s'agglomèrent sur les varicosités dendritiques. Or ce sont les varicosités qui se vacuolisent. Ce résultat suggère un lien entre dysfonctionnement synaptique, vacuolisation et dégénérescence du motoneurone.



## **5 DISCUSSION**

---



La mise au point du protocole expérimental combinant des marquages intracellulaires de motoneurones associés à des marquages immunohistochimiques nous a permis d'étudier spécifiquement les dendrites des motoneurones à différents âges de la maladie. Nous avons ainsi pu confirmer la vacuolisation des mitochondries dans la SLA, observée dans la littérature dans la moelle ventrale. Nous avons démontré que celle-ci avait lieu dans les dendrites des motoneurones, spécifiquement aux endroits où l'activité synaptique est intense. Cette technique nous a également permis d'étudier pour la première fois l'autophagie dans les dendrites, et montrer qu'elle est déficiente également dans ce compartiment neuronal. Enfin, la mise au point des expériences d'électrophysiologie *in vivo* nous a permis d'étudier les circuits prémoteurs dans les conditions les plus proches possibles des conditions physiologiques, et démontrer des dysfonctionnements de certains de ces circuits.



## 5.1 HYPOTHESE DE L'ORIGINE DES VACUOLES

---

Nous avons observé dans les dendrites des motoneurones de souris contrôles et de souris SOD1 des grossissements, que nous avons appelés varicosités. Nous avons vu que les varicosités se vacuolisent dans les souris SOD1, et que les vacuoles présentes dans les varicosités s'accumulent avec l'âge jusqu'à former des déformations dendritiques de 15  $\mu\text{m}$  de diamètre. Leurs membranes colocalisent avec des membranes externes et internes mitochondriales, et avec du réticulum. Il semble que le développement de ces vacuoles commence par une expansion de l'espace intermitochondrial. Les petites vacuoles sont également entourées de marquage de réticulum, laissant supposer que le RE, et peut être les MAM, jouent aussi un rôle dans le début de la vacuolisation mitochondriale. Enfin, nous avons montré que la vacuolisation des dendrites de souris SOD1 a lieu à des emplacements de forte activité synaptique, ce qui suggère un lien entre l'activité synaptique et la vacuolisation.

### 5.1.1 LA VACUOLISATION EST SPECIFIQUEMENT LIEE A LA MUTATION SOD1

Nos analyses anatomiques des dendrites des motoneurones de souris malades ont montré que seules les souris SOD1 développent d'aussi grosses vacuoles. J'ai notamment montré que les souris FUS n'en développent pas ou très peu, et ce jusqu'à P130, bien après le début de la première vague de dénervation des jonctions neuromusculaires qui ont lieu à P80 pour le TS<sup>140</sup>. Ce n'est pas la seule mutation qui ne montre pas de vacuolisation telle que celle observée dans les souris SOD1. Certaines mutations donnent lieu à de petites vacuoles observées dans la moelle épinière chez des patients ou des souris transgéniques<sup>55,144,145</sup>, mais la structure n'est pas la même. Ces vacuoles n'excèdent jamais 2  $\mu\text{m}$ . Les vacuoles observées dans les autres phénotypes seraient plutôt des vacuoles d'autophagie. On peut en effet observer une double

membrane entourer ces vacuoles, et des cargos, des corps de Lewis ou l'accumulation de neurofilaments à l'intérieur. Le mécanisme de formation menant à ces vacuoles est donc différent. Ainsi, la présence et l'accumulation de protéines SOD1 spécifiquement est nécessaire pour la formation de ces grosses vacuoles mitochondriales observées chez les souris portant la mutation sur le gène SOD1.

Cette constatation nous montre que l'hypervacuolisation des mitochondries n'est pas un mécanisme physiopathologique commun à toutes les mutations. Il n'explique donc pas le mécanisme général de la SLA menant à la mort des motoneurones. La vacuolisation extrême des mitochondries est seulement une conséquence de la présence de protéines SOD1 mutées. Cependant, avec les autres mutations, les mitochondries sont systématiquement altérées. D'abord, l'analyse anatomique des mitochondries de tous les patients, quelle que soit la mutation à l'origine de la maladie montre des altérations structurelles des mitochondries. On peut noter en premier lieu une désorganisation du cristae<sup>50,51</sup>. De plus, Kaus et ses collègues<sup>146</sup> décrivent que les protéines issues des mutations sur les gènes C9orf, FUS et TDP43, produisent des désordres mitochondriaux, du stress du réticulum et des problèmes d'homéostasie calcique<sup>146</sup>. Il en résulte une accumulation de ROS et une baisse de la production d'ATP. Stoica et son équipe<sup>147</sup> ont également montré sur des cellules en culture transfectées par des siRNA que la mutation FUS induit une disruption des MAM, les connexions entre RE et mitochondries<sup>147</sup>. La cellule développe des problèmes d'homéostasie notamment parce que le calcium ne peut être recapté par la mitochondrie lors de sa libération du réticulum. La production d'ATP est également diminuée. Deng et al., 2015<sup>148</sup> développent également l'idée que la mutation FUS induit des dommages mitochondriaux, en particulier une fragmentation des mitochondries, la production de ROS et une baisse du potentiel de membrane mitochondrial<sup>148</sup>. Ils expliquent ces altérations par la mauvaise localisation de la protéine nucléolaire FUS qui se lie à la protéine mitochondriale HSP60. Cette protéine fait en partie pénétrer FUS dans la mitochondrie. Wang et ses collègues<sup>144</sup> ont montré que la mutation TDP43 altère la dynamique mitochondriale<sup>144</sup>. Ils ont

montré également une colocalisation de la protéine mutée TDP43 dans la mitochondrie. Enfin, Magrané et al., 2014<sup>55</sup> montrent que le transport est altéré de la même manière dans les souris mSOD1 et mTDP43<sup>55</sup>. Toutes ces études confirment le rôle central de la mitochondrie dans la SLA : on note des problèmes de transport, d'homéostasie calcique, une dérégulation du potentiel membranaire mitochondrial, la production de ROS, et la baisse de production d'ATP, quelle que soit la mutation originelle déclenchant la maladie. La vacuolisation des motoneurones SOD1 n'est qu'une conséquence, mais le problème de dysfonctionnement mitochondrial est, lui, bien présent.

### **5.1.2 ORIGINE MITOCHONDRIALE DES VACUOLES**

Nous avons vu que les mitochondries sont altérées chez les souris SOD1. Le réseau est fragmenté. La dynamique mitochondriale n'est plus équilibrée, la fission est plus active, menant à des mitochondries plus rondes et isolées.

De plus, les marquages immunohistochimiques montrent que les mitochondries sont à l'origine de la vacuolisation dans les varicosités. Lorsque les vacuoles sont petites, la membrane externe entoure la vacuole tandis que la membrane interne est à l'intérieur. Ce serait donc l'espace intermitochondrial qui se vacuoliserait. Ces données seraient en accord avec les observations de microscopie électronique qui montrent que des restes de mitochondries sont présents dans les grosses vacuoles<sup>50,51</sup>. Ces équipes ne montraient pas en revanche que ces vacuoles sont présentes dans les motoneurones, et dans leurs dendrites.

Ces données montrent qu'il y a une accumulation de mitochondries en train de dégénérer, et que la vacuolisation est une étape de leur dégénérescence.

### **5.1.3 HYPOTHESE 1 : LES VACUOLES SONT LIEES A UN AFFLUX D'IONS LOCAL**

Une première hypothèse quant à la formation de ces vacuoles serait un afflux ionique dans la mitochondrie. Pour compenser le stress osmotique qui en

résulte, de l'eau pénètre dans la mitochondrie, ce qui la fait gonfler. Les vacuoles seraient donc des mitochondries qui grossissent sous l'effet de la pression osmotique.

Plusieurs arguments appuient cette hypothèse. D'abord, le fait que l'on trouve la vacuolisation aux endroits où les synapses inhibitrices et les synapses excitatrices de type 2 (VGlut2) sont nombreuses suggère le lien entre activité synaptique et vacuolisation. Ensuite, Ikegaya et al.<sup>138</sup>, Greenwood et al.<sup>52</sup>, et Choi<sup>149</sup> confirment ce lien car lorsqu'ils appliquent du glutamate ou du NMDA sur des neurones en culture, les dendrites gonflent localement. Ils montrent que la vacuolisation qui suit un stress excitotoxique nécessite un afflux d'ions extracellulaires, notamment sodium, chlore et calcium, et qu'il y a un afflux d'eau dans la dendrite. Cependant nos résultats montrent une diminution de l'amplitude des PPSE et une diminution du nombre de PPSI. Sachant que ni la résistance d'entrée ni le potentiel de repos sont modifiés, nous suggérons qu'il y a une baisse des courants excitateurs et inhibiteurs. Or, indépendamment de la force des courants ioniques, il y a probablement un dysfonctionnement des gradients ioniques dans la SLA, qui serait à l'origine de l'accumulation des ions dans le cytoplasme. En effet, la dépolarisation membranaire de la mitochondrie diminue la quantité d'ATP produit<sup>56</sup>, l'ATP ne répond alors plus à tous les besoins cellulaires, notamment celui des pompes qui régulent les gradients ioniques. De plus, des dysfonctionnements des pompes elles-mêmes ont été mis en évidence<sup>150</sup>. L'accumulation de ROS bloque l'ATPase calcique qui extrait le calcium du cytoplasme<sup>77</sup>. L'expression de KCC2, la pompe qui extrait le chlore du milieu intracellulaire est plus faible dans le cytoplasme et à la membrane<sup>151</sup>. Enfin, les ROS et le calcium activeraient également un canal anionique : VSOR<sup>152,153</sup>. Ce canal induit un afflux d'anions dans le milieu intracellulaire<sup>152</sup>. Il a d'ailleurs été montré que les ions chlore et en particulier ce canal sont impliqués dans la formation de vacuoles dendritiques suite à une stimulation glutamatergique<sup>149,154</sup>. Ces résultats suggèrent une accumulation d'ions dans le cytoplasme des motoneurones.

Or d'autres équipes montrent que ce sont les mitochondries de cellules du foie (cellules non excitables) qui gonflent lorsqu'il y a un déséquilibre ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la mitochondrie. Ils expliquent ce gonflement par le fait que la forte concentration ionique à l'extérieur de la mitochondrie induit un prélèvement du calcium par la mitochondrie dans le cristæ. Puis, la forte concentration de calcium à l'intérieur de la mitochondrie peut induire un stress osmotique<sup>155,156</sup>. De l'eau rentre dans la mitochondrie, la faisant gonfler, grâce à des aquaporines présentes sur les membranes mitochondriales externes et internes<sup>157</sup>. Le mPTP a été étudié mais son rôle est incertain dans le transport de l'eau dans la mitochondrie<sup>157</sup>. Or nous avons justement montré que c'est la mitochondrie qui se vacuolise dans les vacuolisations dendritiques. La mitochondrie a un rôle important de tampon calcique en cas de concentration cytosolique importante, surtout dans les motoneurones qui ont peu de tampons calciques. Ainsi la mitochondrie recevrait une grande quantité de calcium aux endroits à forte activité synaptique (lieux de vacuolisation), endroits où les ions s'accumulent dans le cytoplasme. La quantité importante de calcium créerait un stress osmotique et de l'eau rentrerait dans la mitochondrie. L'eau rentre d'abord dans l'espace intermitochondrial, c'est pourquoi on observe dans les petites vacuoles un marquage de membrane externe entourant la vacuole, tandis que la membrane interne est à l'intérieur. Mais la présence d'aquaporines sur les membranes internes des mitochondries suggère que l'eau rentrerait également à l'intérieur du cristæ, lieu où est stocké le calcium. La présence d'eau dans l'espace intermitochondrial et dans le cristæ pourrait expliquer la déstructuration de la mitochondrie, le fait qu'on n'observe plus de colocalisation des marqueurs TIM et TOM dans les souris SOD1, et le fait qu'on observe à la fois des marqueurs de membrane externe et interne sur le pourtour des grosses vacuoles.

Enfin, la présence de réticulum autour des vacuoles pourrait être liée au fait que les mitochondries et le RE sont en étroite apposition dans les cellules par les MAM en condition physiologique. Les mitochondries se vacuolisent mais les membranes seraient toujours proches. De plus, le RE stressé communique avec les mitochondries via des signaux calciques. La présence des vacuoles pourrait

éventuellement expliquer la désorganisation des MAM et la déstructuration du continuum du RE. En effet, les vacuoles, lorsqu'elles grossissent, doivent pousser et éventuellement écraser le RE.

#### 5.1.4 HYPOTHESE 2 : LES VACUOLES PROVIENNENT DES PEROXYSONES

Les marquages immunohistochimiques et l'analyse au microscope confocal de la calréticuline ne permettent pas de juger, à ce niveau de résolution, si le réticulum est accolé à la membrane des mitochondries qui se vacuolisent, ou si les membranes des vacuoles sont constituées de membranes de réticulum en plus des membranes mitochondriales. La deuxième hypothèse que nous développons ici propose que les membranes du réticulum soient impliquées dans la formation des vacuoles de varicosités. En effet, le récent travail de l'équipe de McBride<sup>158</sup> montre que de nouveaux peroxysones peuvent naître de la fusion de pré-peroxysones issus des mitochondries et du RE. Les vacuoles seraient donc des fusions de vésicules pré-peroxysonales issues des deux organites.

##### 5.1.4.1 PEROXYSONES ET SLA

Les peroxysones sont des organites dont les fonctions sont nombreuses dans les processus métaboliques. Ils oxydent les très longues chaînes d'acides gras, détoxifient le peroxyde d'hydrogène, et synthétisent des phospholipides<sup>159</sup>. La quantité de peroxysones présents dans une cellule est maintenue par une balance entre leur biogénèse et leur élimination. Ils sont générés soit par division de peroxysones préexistants, soit par formation *de novo* issu du RE.

Deux études montrent que le nombre des peroxysones est réduit aux stades pré-symptomatique et symptomatique dans les motoneurones de souris SOD1<sup>160,161</sup>. Au stade final seulement, les récepteurs PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor* : facteurs de transcription régulant la prolifération des peroxysones) sont brusquement augmentés chez les souris SOD1<sup>162</sup>. Ensuite,

les problèmes de transport répertoriés dans l'introduction<sup>91,99-103</sup> rendent probablement difficile le transport des peroxysomes dans les dendrites, donc les dendrites se retrouveraient appauvries en peroxysomes. Enfin, de nouvelles études pointent le lien entre mitochondries et peroxysomes, et le fait que les peroxysomes sont altérés suite à l'altération des mitochondries<sup>163</sup>.

Pourtant, les peroxysomes sont bénéfiques dans la SLA. L'activation d'agonistes de facteurs de transcription PPAR et de leur cofacteur PGC-1a réduit les manifestations de la maladie : amélioration des fonctions motrices, prolongement de la survie, protection des motoneurones, restauration de la chaîne respiratoire mitochondriale, diminution de l'inflammation des microglies<sup>161,164-168</sup>. Les souris SOD1 ont donc une diminution de leur nombre de peroxysomes, qui serait liée à la dégénérescence des motoneurones.

#### 5.1.4.2 HYPOTHESE DES PEROXYSONES A L'ORIGINE DES VACUOLES

Les peroxysomes se multiplient en condition physiologique par fission<sup>169,170</sup>. Mais il est connu qu'en parallèle de la fission, ou en l'absence de peroxysomes existants dans la cellule, une autre synthèse de nouveaux peroxysomes a lieu à partir de vésicules prenant naissance du RE<sup>169,170</sup>. De nombreuses protéines de la famille PEX sont nécessaires à cette nouvelle formation. Les protéines membranaires nécessaires au fonctionnement des peroxysomes sont ainsi fournies par le RE. Les protéines de la matrice des peroxysomes, solubles, sont ensuite internalisées dans les peroxysomes depuis le cytoplasme grâce à des protéines translocatrices membranaires. Il a déjà été montré que plusieurs vésicules pré-peroxysomales, contenant des protéines distinctes, doivent fusionner pour former des peroxysomes fonctionnels<sup>171</sup>. Jusqu'à maintenant, toutes ces équipes montrent que seul le RE est impliqué dans la naissance de nouveaux peroxysomes. Mais Sugiura et al.<sup>158</sup> montrent que des protéines PEX sont intégrées à la mitochondrie, puis que des vésicules pré-peroxysomales prennent naissance de la mitochondrie. Ces vésicules forment ensuite un rétrécissement au niveau du rattachement avec la mitochondrie (cou) avant d'être

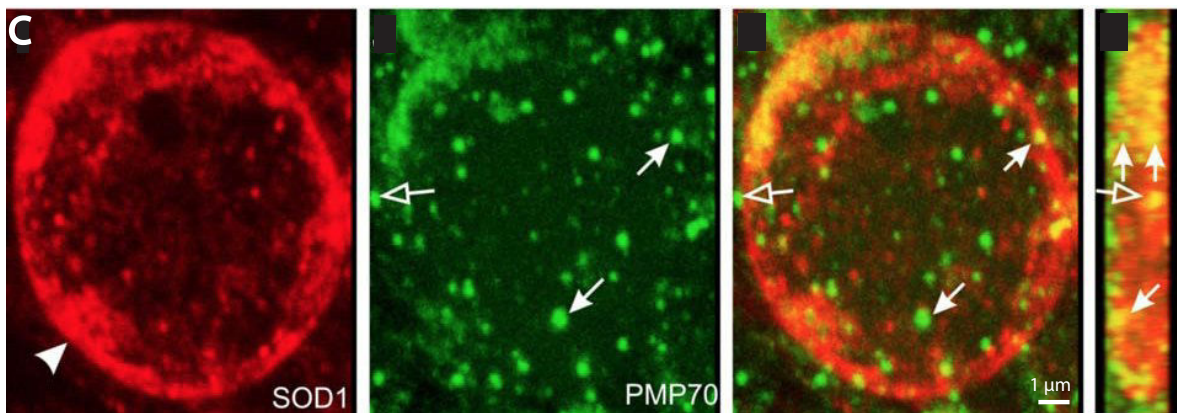
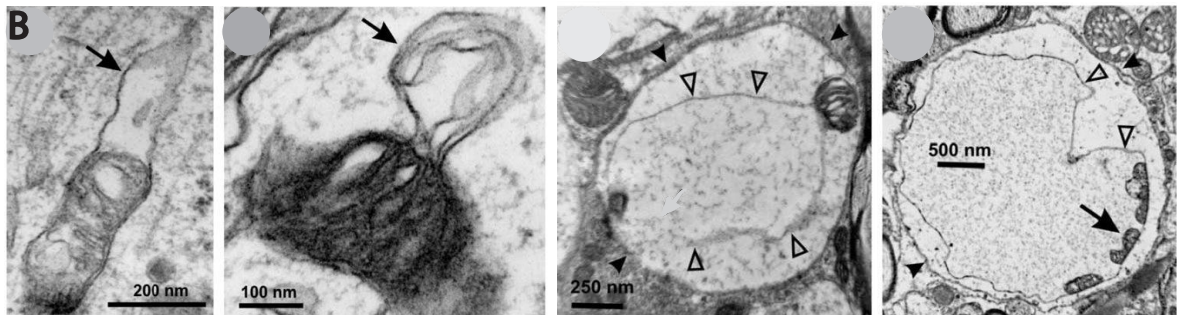
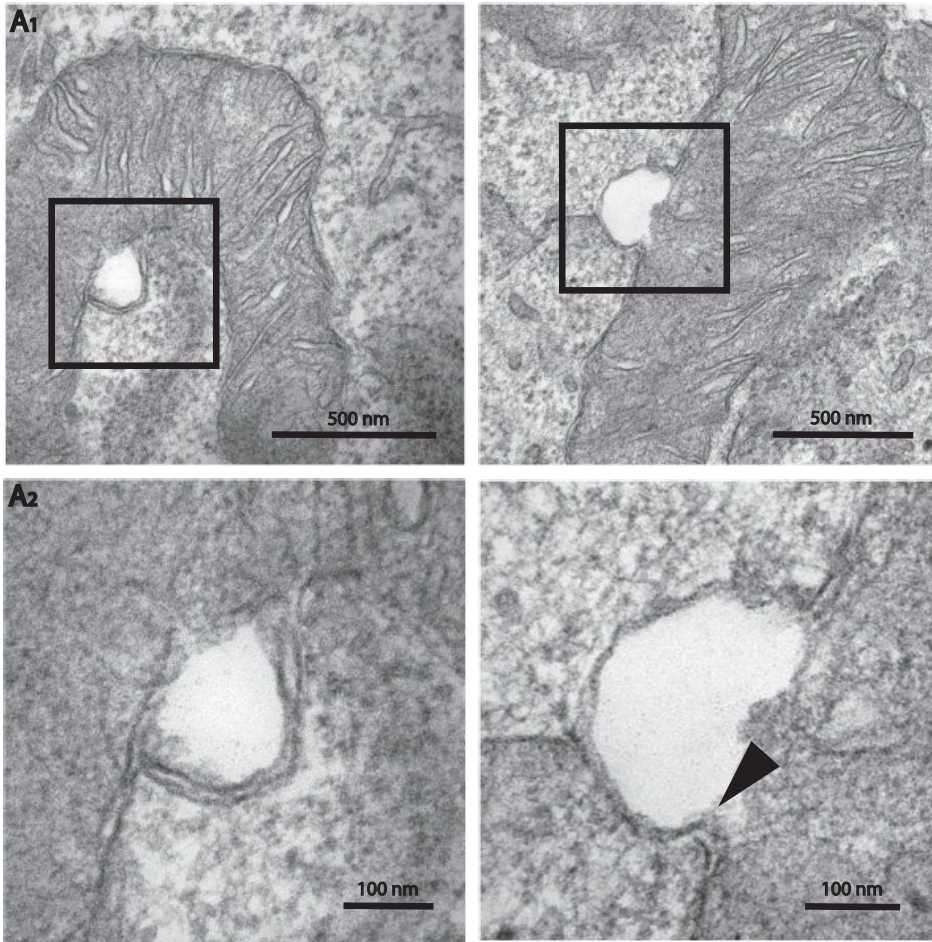
détachées de celle-ci. Puis elles fusionnent avec d'autres vésicules pré-peroxysomales issues du RE pour apporter toutes les protéines nécessaires aux peroxysomes matures. Ce mécanisme est notamment actif lorsque la cellule est appauvrie en peroxysomes, ou lorsque ceux-ci ne sont pas fonctionnels.

Or, chez les souris SOD1, les peroxysomes sont très probablement affectés par la mutation. Le mécanisme de formation de nouveau peroxysomes doit donc être augmenté chez les souris SOD1. En effet, des structures telles que les vésicules pré-peroxysomales observées par l'équipe de McBride<sup>158</sup> (Figure 36A) sont observées par l'équipe de Higgins<sup>51</sup> comme étant le début de la vacuolisation mitochondriale chez les souris SOD1 (Figure 36B). De plus, Higgins et al.<sup>51</sup> montrent également que PMP70, une protéine peroxysomale, est située dans la mitochondrie vacuolisée (Figure 36C).

Tous ces résultats suggèrent que des vésicules pré-peroxysomales naissent de la mitochondrie. Mais la séparation de la mitochondrie est défectueuse. Les vésicules pré-peroxysomales provenant du réticulum viennent fusionner avec celles naissant de la mitochondrie. Il en résulte de grandes structures formées de mitochondrie, mais aussi de membranes du réticulum, qui forment les vacuoles observées dans les dendrites.

L'autophagie étant déjà défectueuse au moment de l'apparition des vacuoles, elle ne peut pas éliminer ces structures hybrides défectueuses. Le processus de formation des peroxysomes continuant avec l'évolution de la maladie, les vacuoles s'accumulent pour former les grosses zones noires que j'ai observées.





**Figure 36 : Les peroxysomes peuvent être à l'origine de la vacuolisation des mitochondries.**

**A :** Exemples de formation de vésicules pré-peroxysomales d'origine mitochondriale observées en microscopie confocale.  $A_2$  est un agrandissement des carrés en  $A_1$ . La flèche montre le rétrécissement des vésicules pour former le « cou ». **B :** Exemples de vacuolisations de mitochondrie observées en microscopie confocale. Noter la similitude avec les vésicules pré-peroxysomales observées en A. Les flèches pleines pointent les bourgeons mitochondriaux. Les flèches vides marquent la membrane vacuolaire. La grosse flèche indique les restes de membrane interne. **C :** Marquage immunohistochimique des vacuoles mitochondriales marquées par la protéine SOD1 (rouge) dont Higgins et al. ont montré qu'elle s'accumule à l'intérieur de la vacuole près de la membrane externe de la mitochondrie. PMP70 marque les peroxysomes (vert). Plusieurs sont situés dans la vacuole. La dernière photo illustre la même vacuole qui a subi une rotation de 90°. Les flèches pleines illustrent les peroxysomes sur la membrane de la vacuole. Les flèches vides montrent des peroxysomes qui ne sont pas dans la mitochondrie, mais autour, accolés à la membrane externe. A est modifié de Sugiura et al., 2017<sup>158</sup>. B et C sont modifiés de Higgins et al., 2003<sup>51</sup>.

### 5.1.5 LES VACUOLES NE SONT PAS ELIMINEES PAR L'AUTOPHAGIE

L'autophagie est déficiente chez les souris SOD1 atteintes de SLA. Le processus n'évolue pas de la même façon selon l'âge de la souris et selon le compartiment étudié. A P12, nous avons vu que, dans la moelle ventrale et dans les somas des motoneurones, l'autophagie est exacerbée et qu'elle est efficace. C'est un âge où les souris ne développent pas de symptômes, malgré la présence de la mutation. Le fonctionnement des motoneurones est probablement maintenu par la suractivation de l'autophagie qui compense les effets de la mutation. En revanche, dès P50, des perturbations apparaissent dans l'autophagie : l'analyse de la moelle montre une diminution de l'autophagie, l'analyse par immunohistochimie montre un nombre de vacuoles d'autophagie inchangé dans le soma et les dendrites, mais un blocage du processus dans les somas des motoneurones spécifiquement. L'exacerbation de l'autophagie dans la moelle n'est pas due à une exacerbation dans les motoneurones. Donc d'autres cellules de la moelle : interneurones, cellules gliales, doivent avoir une autophagie exacerbée. Sachant que la protéine SOD1 mutée est exprimée dans toutes les cellules, d'autres populations neuronales subissent les effets de la

mutation. Mais seuls les motoneurones et les cellules corticospinales dégénèrent. L'exacerbation de l'autophagie dans les autres populations neuronales suggère que l'autophagie est protectrice, et que le blocage de l'autophagie spécifiquement dans les motoneurones provoque ou au moins contribue à la dégénérescence des motoneurones au cours de la SLA. En effet, le traitement de souris SOD1 avec du lithium ou du tréhalose, deux activateurs de l'autophagie, augmente la survie de la souris, diminue la mort neuronale, et élimine les vacuoles observées dans les mitochondries<sup>50,96</sup>. Au sein des dendrites, le manque d'exacerbation de l'autophagie coïncide avec la vacuolisation des varicosités, suggérant que le déficit de l'autophagie provoque l'accumulation des vacuoles de varicosités. Ce manque d'exacerbation de l'autophagie peut être dû à Parkin, une protéine qui induit la mitophagie lorsque les mitochondries endommagées sont identifiées par Pink1. En effet, nous avons vu que, dans la moelle, Parkin était fortement diminuée à P50 et à P70, ce qui empêche l'adressage des mitochondries endommagées dans le processus de l'autophagie, et provoque l'accumulation de ces mitochondries. Même si l'autophagie était exacerbée, sans Parkin les mitochondries ne seraient pas éliminées. Ce résultat peut expliquer pourquoi les activateurs de l'autophagie (lithium et tréhalose) n'empêchent pas la mort de tous les motoneurones : malgré l'augmentation de l'autophagie, les mitochondries sont mal éliminées. Ce résultat est très intéressant, puisqu'il met en évidence un mécanisme qui explique pourquoi et comment les mitochondries sont déficientes dans la SLA : elles ne sont pas éliminées par manque de Parkin. Parkin n'avait jamais été étudiée dans le cadre de la SLA. Pour vérifier que l'origine de l'accumulation des mitochondries est bien Parkin, il serait intéressant de surexprimer Parkin dans les motoneurones spécifiquement. On pourrait injecter intramusculairement un rétrovirus dont le plasmide contiendrait Parkin et évaluer les effets de la surexpression de Parkin sur la présence de la vacuolisation dans les dendrites, la structure du réseau mitochondrial, et plus largement sur les capacités motrices de la souris.

A P90, l'inhibition de l'autophagie augmente. Dans les trois compartiments étudiés : la moelle, les somas des motoneurones et leurs dendrites, on observe

une accumulation des autophagosomes marqués par p62, donc un blocage de l'autophagie. Il est intéressant de noter que le blocage ne commence pas dans tous les compartiments au même moment : il commence dans les somas à P50, puis est présent dans les dendrites et dans la moelle à P90. C'est probablement parce que le blocage est tardif dans les dendrites qu'il apparaît tardivement dans les analyses de moelle. En effet, l'arborisation dendritique des motoneurones est très grande, en comparaison avec le soma, et avec les autres neurones et cellules présentes dans la moelle ventrale. L'apparition du blocage dans les dendrites peut être due aux problèmes de transport décrits dans les dendrites et l'axone des motoneurones de souris SOD1<sup>55,99</sup>. Les autophagosomes ne seraient plus transportés vers les lysosomes. De plus, les vacuoles déstructurent probablement le cytosquelette et empêchent le transport des organites le long des microtubules. Enfin, elles encombrent l'espace cytosolique. Il est difficile d'imaginer que le transport est efficace dans ces conditions. En effet, on peut voir sur nos images l'accumulation des vacuoles d'autophagie autour des vacuoles de varicosités. Celles-ci pourraient ainsi contribuer au blocage qui apparaît dans les dendrites à P90, et donc augmenter le déficit autophagique.

## 5.2 HOMEOSTASIE DE L'EXCITATION ET DE L'EXCITABILITE

---

### 5.2.1 BAISSSE DES COURANTS EXCITATEURS ET INHIBITEURS

Nous avons vu que la courbe de recrutement des fibres Ia n'est pas modifiée par la mutation, mais que l'amplitude des PPSE émis par le motoneurone lors de la stimulation des fibres Ia est réduite. Les expériences de stimulations appariées montrent que la baisse de l'amplitude des PPSE est d'origine synaptique. Marcin Bączyk, post-doctorant au laboratoire, a également réalisé une autre expérience au cours de laquelle il a stimulé une voie

vestibulospinale et réticulospinale, le MLF (faisceau longitudinal médian), qui se projette de manière monosynaptique et disynaptique sur les motoneurones spinaux (Bączyk et Martinot, en préparation). L'analyse des PPSE monosynaptiques montre une baisse de l'amplitude équivalente à celle enregistrée lors de la stimulation des fibres Ia. Ainsi il y a une baisse de l'excitation pour au moins deux circuits sur les motoneurones du TS chez les souris SOD1. Ces deux circuits impliquent deux types de synapses différentes : les synapses Ia de type VGlut1, et les synapses de la voie descendante du MLF de type VGlut2. Donc les deux types de synapses excitatrices projetant sur le motoneurone semblent affectés. Ce résultat suggère que puisque les deux types de synapses VGlut1 et VGlut2 sont altérés à P50, de manière globale les entrées synaptiques excitatrices projetant sur les motoneurones seraient altérées chez les souris SOD1 à un stade présymptomatique. Nous pouvons déduire de ces résultats que puisque les PPSE ont des amplitudes plus faibles, et puisque les motoneurones ne sont pas hyperexcitables<sup>119</sup>, leur sommation au soma conduit à un plus petit voltage. Il est plus difficile pour les PPSE d'atteindre le seuil de décharge des motoneurones. Ainsi les motoneurones de souris SOD1 déchargeraient moins que les motoneurones de souris contrôles. La jonction neuromusculaire serait alors moins activée, et les fibres musculaires moins recrutées. La baisse de l'activation des jonctions neuromusculaires pourrait participer à leur rétractation<sup>172</sup>.

Nous avons vu également que la courbe de recrutement des interneurones inhibiteurs est modifiée et que la probabilité d'apparition des PPSI est diminuée. Cela suggère que les circuits inhibiteurs sont hypoexcitables. En parallèle de l'hypoexcitabilité des interneurones inhibiteurs, nous avons essayé d'étudier l'amplitude des PPSI. Mais le peu de PPSI enregistrés dans les motoneurones SOD1 et la grande diversité des circuits recrutés n'a pas permis de conclure à un résultat. Cependant les études préliminaires (non montrées) réalisées sur quelques motoneurones suggèrent qu'il y aurait éventuellement une baisse de l'amplitude des PPSI également. Ce résultat semble se corrélérer aux précédentes études réalisées sur les entrées synaptiques inhibitrices glycinergiques<sup>173</sup>. En

revanche les études réalisées sur les courants GABAergiques semblent montrer des courants similaires<sup>137,173,174</sup> ou légèrement augmentés<sup>174</sup> à faible intensité de stimulation chez les souris SOD1<sup>G93A</sup> par rapport aux souris contrôles. On peut déduire de ces résultats qu'il y aurait également une baisse globale des courants inhibiteurs chez les souris SOD1.

Il est difficile d'évaluer la balance excitation/inhibition qui résulte au soma du motoneurone. En effet, nous n'avons étudié que deux circuits excitateurs monosynaptiques (afférences Ia et voies descendantes du MLF), et plusieurs circuits inhibiteurs tous confondus, disynaptiques au minimum et dont les latences sont variables. Dans tous les cas, circuits excitateurs et inhibiteurs sont affectés et les deux types de courants sont diminués.

## 5.2.2 ORIGINE DE LA BAISSÉ DES COURANTS SYNAPTIQUES

Les expériences de stimulations appariées nous montrent que la baisse de l'amplitude des PPSE est d'origine synaptique. La diminution du nombre de sous-unités GluR2 des récepteurs AMPA, et le fait que la diminution de l'amplitude des PPSE se retrouve pour deux types de synapses impliquées dans deux circuits différents, suggèrent un dysfonctionnement de la synapse d'origine post-synaptique. Francesco Roselli (Bączyk et Martinot, en préparation) montre qu'il n'y a pas de différence du nombre de sous-unités GluR1 à la membrane sous les synapses Ia, mais une diminution de la forme phosphorylée de GluR1, qui est la forme active. Cette diminution de l'ordre de 30% pourrait être à l'origine de la baisse de l'amplitude des PPSE. Une origine post-synaptique des défauts synaptiques suggérerait que toutes les synapses excitatrices projetant sur les motoneurons seraient affectées, y compris les synapses di- et trisynaptiques, indépendamment de l'excitabilité des interneurons excitateurs.

Chang et Martin<sup>173</sup> montrent également une origine post-synaptique de la diminution des amplitudes de PPSI à un stade très précoce. Selon eux, il y aurait une diminution du nombre de récepteurs glycinergiques sous les synapses

glycinergiques. La composition du récepteur serait également altérée, avec une plus faible quantité de sous-unités GlyR $\alpha$ 1.

Au niveau post-synaptique également, on peut se demander si la présence de vacuoles sur l'arborisation dendritique est à l'origine de la diminution de la taille des réponses enregistrées au soma. Les synapses Ia étant situées sur le soma et sur les dendrites proximales, il y a peu de chances que la vacuolisation ait une influence sur les PPSE monosynaptiques Ia. En revanche, pour les synapses excitatrices VGlut2 que l'on a activées en stimulant le MLF, la vacuolisation pourrait, soit repousser les boutons synaptiques lors de son accroissement et diminuer ainsi la zone active, soit changer les propriétés intrinsèques locales du motoneurone, et donc changer les courants synaptiques. Pour les synapses inhibitrices, il est possible que la vacuolisation explique la diminution des PPSI également.

Cependant, rien ne prouve dans nos expériences qu'il n'y a pas également un dysfonctionnement pré-synaptique. D'ailleurs, le manque d'excitabilité des interneurons inhibiteurs, qui sont excités par la stimulation des fibres afférentes dont les fibres Ia, suggère éventuellement que la synapse Ia est également déficiente sur les interneurons inhibiteurs, soit à un niveau post-synaptique qui peut être similaire à celui observé dans les motoneurons, soit à un niveau pré-synaptique. Dans ce cas, la projection des afférences Ia sur les interneurons excitateurs engendre des hypoexcitations sur les interneurons excitateurs également. De plus, une autre équipe montre un ralentissement de la fusion des vésicules pré-synaptiques avec la membrane à la synapse<sup>175</sup>, qui pourrait expliquer la baisse des courants excitateurs à P90. Enfin, il peut également y avoir une modification de l'excitabilité des interneurons excitateurs. Ces résultats seraient à vérifier en étudiant les PPSE di- et trisynaptiques. Quoiqu'il en soit, ces résultats montrent que des circuits pré-moteurs sont impliqués dans la physiopathologie de la SLA et dans la dégénérescence des motoneurons.



### 5.2.3 EVOLUTION DE L'EXCITABILITE AVEC LA MALADIE

L'excitabilité des motoneurones de souris SOD1 évolue avec l'âge, et avec la maladie. Chez les souriceaux, certains motoneurones sont hyperexcitables. Ce sont les motoneurones qui seront résistants à la maladie. Les motoneurones vulnérables ont une excitabilité normale à cet âge<sup>117</sup>. A P50 en revanche, les motoneurones résistants ont une excitabilité normale et les motoneurones vulnérables sont hypoexcitables. Donc on observe une baisse de l'excitabilité de tous les motoneurones avec l'âge, mais l'évolution est différente selon la vulnérabilité des motoneurones à la maladie. Les motoneurones vulnérables (FF) ont une baisse de l'excitabilité plus rapide que les motoneurones résistants (S), et sont justement les premiers dont les jonctions neuromusculaires se rétractent à P60. Donc la baisse de l'excitabilité d'un motoneurone est probablement un facteur influençant les problèmes physiologiques et sa dégénérescence dans la maladie.

Avec l'excitabilité évolue l'excitation des motoneurones avec l'âge. A P50, nous avons montré qu'il n'y a pas de différence synaptique ni sur le soma, ni sur l'arborisation dendritique. En revanche à P90 la densité synaptique évolue sur le soma, il y a globalement une perte du nombre net de synapses. Malgré une augmentation du nombre de synapses excitatrices, la diminution du nombre de synapses inhibitrices est plus forte<sup>128</sup>. Nous avons montré que le motoneurone reçoit moins de courants excitateurs et moins de courants inhibiteurs, donc les synapses sont moins efficaces.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la perte de synapses inhibitrices et le gain de synapses excitatrices entre P50 et P90.

Une première hypothèse serait que les synapses se détachent du motoneurone à cause de leur faible activité à P50. Les synapses inhibitrices sont notamment très peu actives sachant qu'il est difficile de recruter les interneurones inhibiteurs. Cette hypothèse expliquerait donc la différence d'évolution des synapses avec l'âge entre excitation et inhibition.



Une autre hypothèse qui explique elle aussi l'évolution différente des synapses est que l'évolution du nombre de synapses serait une réponse compensatoire à la perte de l'excitabilité des motoneurones, qui commence déjà pour les motoneurones FF à P50.

Une troisième hypothèse quant à la perte synaptique serait que les vacuoles des varicosités en grossissant déplacent les boutons synaptiques qui se détachent alors. Mais les varicosités étant entourées de synapses excitatrices VGlut2 et de synapses inhibitrices, cette hypothèse n'explique pas le gain de synapses excitatrices à P90, elle explique plutôt une perte des deux types de synapses.

Cependant, l'étude réalisée par Sunico et al.<sup>128</sup> se limite au soma. On ne sait donc pas comment évoluent les synapses excitatrices sur les dendrites. Il est possible que les vacuoles de varicosités détachent les synapses excitatrices des dendrites, et qu'il y ait une réorganisation pour augmenter le nombre de synapses au soma. Cette quatrième hypothèse mélange les deux hypothèses précédentes : les synapses se détachent des dendrites car elles ne sont plus actives, mais se recentrent sur le soma afin de compenser la faible excitabilité des motoneurones. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en marquant par immunohistochimie les synapses sur des motoneurones marqués intracellulairement à P90.

Donc, avec l'âge, on tend vers une perte de l'excitabilité des motoneurones, et une diminution des courants reçus, puis une augmentation du nombre de synapses excitatrices. Mais si les motoneurones meurent, c'est que l'homéostasie de l'excitabilité n'est pas maintenue, malgré l'augmentation des synapses excitatrices à P90. En effet, Saxena et al.<sup>176</sup> montrent qu'en augmentant l'excitation reçue par les motoneurones, la durée de vie de la souris SOD1 augmente. Il est intéressant de constater que l'augmentation de l'excitation diminue le stress du réticulum et les agrégats de SOD1, suggérant un lien entre l'excitation du motoneurone et le stress du RE. Naujock et al.<sup>124</sup> montrent qu'en augmentant l'excitabilité des motoneurones en bloquant les canaux potassiques

pour rétablir le ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , les motoneurones en culture ont un stress du RE diminué et une signalisation apoptotique réduite.

## 5.3 PERSPECTIVES

---

La diminution de l'amplitude des PPSE n'a été démontrée que pour deux circuits : la projection monosynaptique des afférences proprioceptives, et les voies descendantes du MLF. Il serait intéressant d'étudier si la baisse de l'amplitude des PPSE se confirme sur d'autres circuits excitateurs. Il serait par exemple possible de stimuler le nerf du Sural, un nerf composé majoritairement d'afférences cutanées, lors de l'enregistrement du nerf du Triceps Surae, afin d'analyser les PPSE di et trisynaptiques. De même, il serait intéressant de poursuivre l'étude sur les PPSI du circuit de l'inhibition réciproque la, par exemple entre le couple PBST/Quadriceps, afin de caractériser une éventuelle évolution de l'amplitude des PPSI.

Les vacuoles apparaissent là où l'activité synaptique est intense, ce qui suggère un lien entre ces deux problèmes. Pour vérifier si le dysfonctionnement synaptique est du au moins en partie aux vacuoles, il serait intéressant de traiter les souris au lithium pour stimuler le processus de l'autophagie, et éliminer les mitochondries défectueuses avant l'apparition des vacuoles. Après traitement de souris au lithium et au sérum physiologique (contrôle), nous pourrions vérifier si les vacuoles sont toujours présentes, ou si l'autophagie était suffisante pour les éliminer, puis réaliser des expériences électrophysiologiques afin d'étudier l'amplitude des PPSE. De même, sachant que les souris FUS ne développent apparemment pas de vacuoles, il serait intéressant d'étudier l'amplitude des PPSE la chez ces souris. Dans les deux expériences citées, une amplitude non modifiée confirmerait le lien entre la vacuolisation et les dysfonctionnements synaptiques.

## 5.4 CONCLUSION SUR L'HYPOTHESE DE L'EXCITOTOXICITE

---

### 5.4.1 PAS D'EXCITOTOXICITE GLUTAMATERGIQUE

L'excitotoxicité telle qu'elle a été proposée comme modèle menant à la dégénérescence des motoneurones au cours de la SLA n'est pas valide. En effet, l'excitotoxicité était présentée comme une augmentation de l'excitation produite sur le motoneurone, ou une augmentation de l'excitabilité du motoneurone, ce qui conduit le motoneurone à décharger plus de potentiels d'action. Par l'augmentation de sa décharge, les canaux calciques voltage dépendant font entrer une grande quantité de calcium dans le cytoplasme, conduisant à de multiples réactions dégénératives.

A P50, loin d'être hyperexcitables, les motoneurones ont tendance à devenir hypoexcitables<sup>119</sup>. De plus, nous venons de montrer qu'il n'y a pas de perte de synapses inhibitrices ni de gain de synapses excitatrices à P50, donc la balance excitation/inhibition n'est pas modifiée par le nombre de synapses. Enfin, nous avons vu que les synapses excitatrices sont déprimées dans deux circuits excitateurs : le circuit monosynaptique Ia et le circuit monosynaptique des voies descendantes du MLF. Il est probable que le motoneurone voit sa décharge de potentiel d'action diminuée, à l'inverse de l'hypothèse de base. Ainsi, malgré la perte de fonction des canaux glutamatergiques astrocytaires dont le rôle est de recapter le glutamate après sa libération des vésicules pré-synaptiques<sup>108</sup>, les motoneurones ne montrent pas de signes d'excitotoxicité glutamatergique à P50.

### 5.4.2 DYSFONCTIONNEMENTS METABOLIQUES LIES AU CALCIUM

#### 5.4.2.1 DEFINITION DE L'HOMEOSTASIE CALCIQUE

L'homéostasie calcique fait référence à la régulation de la concentration calcique intracellulaire et aux processus mis en jeu pour la réguler. La

concentration calcique à l'intérieur des neurones doit être faible, afin de permettre, lors d'une stimulation synaptique, de contribuer à la décharge de potentiels d'action. Lors d'une stimulation, le calcium rentre par les canaux AMPA lorsqu'ils sont perméables aux calcium (ceux qui ne contiennent pas la sous-unité GluR2), et les NMDA, puis par l'ouverture des canaux calciques voltages dépendants (VDCC). La concentration intracellulaire augmente également par la libération du calcium du réticulum. Puis la concentration calcique intracellulaire diminue grâce à des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et des pompes ATPases  $\text{Ca}^{2+}$  qui excluent le calcium du cytoplasme dans le milieu extracellulaire. Ces pompes nécessitent de l'énergie. Des protéines tampons, comme la calbindine, captent le calcium dans le cytoplasme. Enfin, le réticulum et la mitochondrie stockent le calcium afin de réduire sa concentration cytoplasmique rapidement. Le calcium de la mitochondrie est ensuite exclu dans le milieu extracellulaire par les pompes calciques<sup>77</sup>.

Or, les motoneurones sont particulièrement sensibles à une dérégulation de l'homéostasie calcique. En effet, les motoneurones contiennent moins de protéines tampons comme la calbindine<sup>142</sup>, la mitochondrie a donc un rôle tampon plus important. Le réticulum possède plus de canaux IP3R qui relarguent le calcium dans le cytoplasme<sup>87</sup>, et les récepteurs AMPA sont perméables au calcium puisque peu d'entre eux possèdent la sous-unité GluR2<sup>177</sup>.

#### **5.4.2.2 PERTE DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE DANS LES SOURIS SOD1**

Certaines études mettent en évidence une perturbation de l'homéostasie calcique des motoneurones chez les souris SOD1.

Le fait que les motoneurones spinaux meurent, à l'inverse des motoneurones oculomoteurs qui possèdent un pouvoir tampon supérieur, montre la dérégulation du calcium dans les motoneurones<sup>60</sup>. De plus, il a été décrit une augmentation de la concentration calcique dans le cytosol<sup>175,178</sup> et une altération dans la clairance du calcium après une excitation synaptique<sup>58</sup>.

L'accumulation du calcium peut être due à une entrée de calcium extracellulaire. En effet, le blocage des VDCC sur des motoneurones en

culture<sup>178</sup>, ou la génèse de récepteurs AMPA imperméables au calcium dans les motoneurones de souris SOD1, ralentit le début de la maladie et augmente la survie des souris. Le courant calcique pourrait ainsi être augmenté, malgré une diminution des courants excitateurs, comme le suggèrent Calvo-Gallardo et al.<sup>175</sup>.

Il y a également un dysfonctionnement intracellulaire des mécanismes qui régulent la concentration calcique : les MAM se désorganisent<sup>87</sup>, le pouvoir tampon des mitochondries et du réticulum est diminué dans les souris SOD1<sup>60,76,179</sup>. D'ailleurs le RE est déplété en calcium<sup>76</sup>. Enfin, l'extrusion du calcium par les pompes est également affecté par la mutation<sup>77,150</sup>.

Or une trop grande concentration calcique dans le cytoplasme crée des dysfonctionnements dans les motoneurones : une quantité trop importante de calcium dans la mitochondrie dépolarise le potentiel mitochondrial<sup>177</sup>, donc réduit la production d'ATP. Le calcium provoque la production de ROS<sup>177</sup> par la mitochondrie, et finit, après avoir dépassé un seuil critique, par ouvrir le pore mPTP et induire la dégénérescence mitochondriale. Le calcium promeut le mauvais repliement et l'accumulation des protéines SOD1<sup>180</sup>, la déplétion du calcium du RE, et le mauvais fonctionnement de l'ATPase calcique<sup>77</sup>.

Malgré une faible excitation des motoneurones qui démontre qu'il n'y a pas d'excitotoxicité glutamatergique, certaines études suggèrent l'accumulation de calcium dans le cytoplasme des motoneurones.

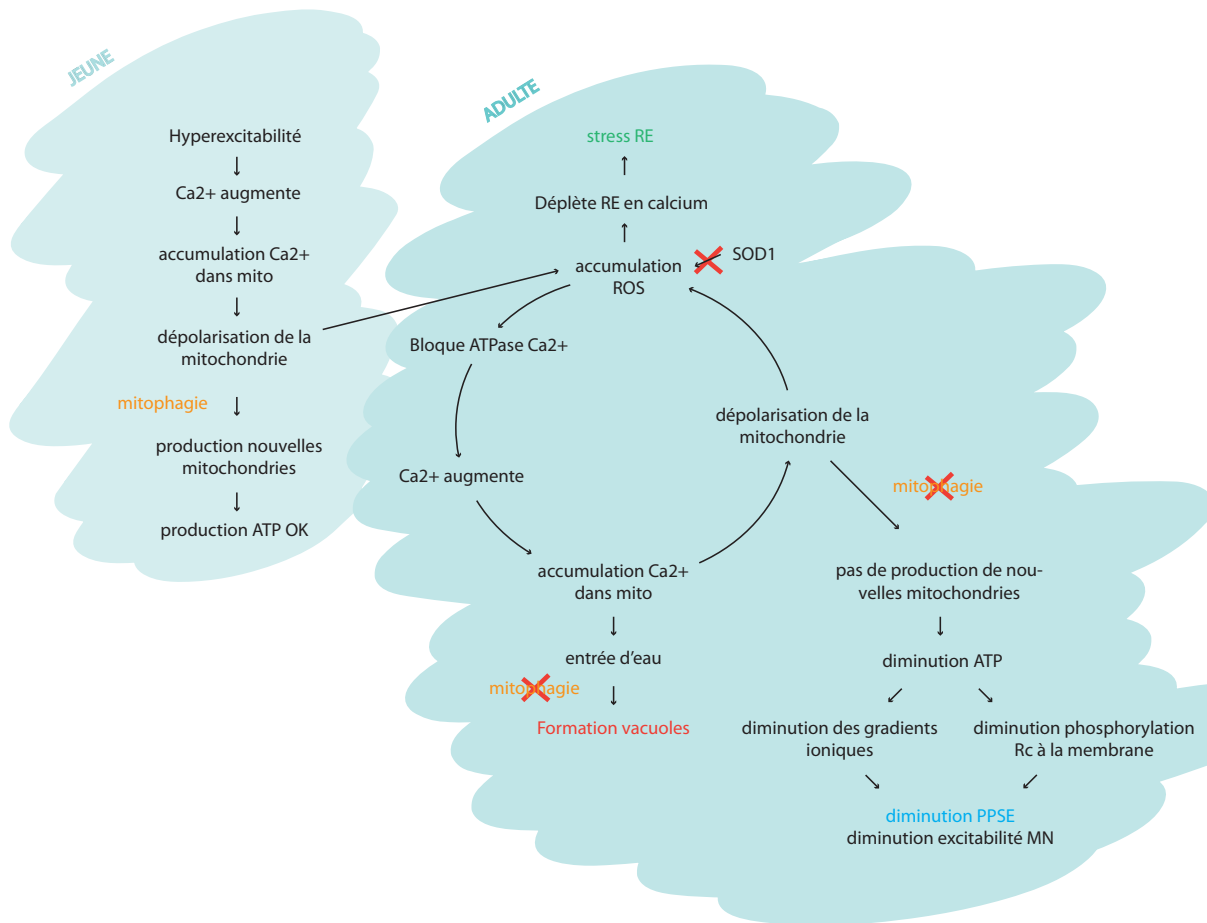
### 5.4.3 TOXICITE CALCIQUE

Tous nos résultats, additionnés aux connaissances que nous avons de l'homéostasie calcique, peuvent alors être rassemblés pour formuler une hypothèse quant à la dégénérescence des motoneurones chez les souris SOD1.

L'hyperexcitabilité des motoneurones de souris au stade embryonnaire<sup>116</sup>, puis au stade postnatal pour certains motoneurones<sup>117</sup>, engendre des courants synaptiques plus importants dans les motoneurones, donc une plus importante entrée d'ions sodium et calcium par les récepteurs AMPA et VDCC. La

mitochondrie, pour diminuer la concentration ionique du cytoplasme, pompe ces deux ions. La quantité importante de calcium dépolarise la membrane mitochondriale, qui produit des ROS et diminue la production d'ATP<sup>177</sup>. Mais nous avons vu que l'autophagie était augmentée dans les souris SOD1 à et âge, permettant un bon renouvellement des mitochondries endommagées. Les mitochondries sont ainsi capables de produire suffisamment d'ATP pour maintenir les gradients ioniques. Chez les souris, l'autophagie et la mitophagie semblent compenser les effets qui seraient induits par le calcium, sauf pour les ROS qui seraient mal éliminés par la protéine SOD1<sup>38,39</sup>, et qui s'accumuleraient avec l'âge (Figure 37).

A un stade plus tardif, les ROS sont nombreux, ils bloqueraient alors l'ATPase calcique, et déplèteraient le calcium du RE<sup>77</sup>. Le calcium s'accumulerait alors dans le cytoplasme. Les mitochondries pomperaient le calcium, mais sa forte concentration endommagerait celles-ci. Or nous avons vu qu'avec l'âge, l'autophagie est inhibée. Les mitochondries ne se renouvellent plus assez, la production d'ATP diminue, ce qui diminuerait les gradients ioniques. Le sodium s'accumulerait alors également dans le cytoplasme. La mitochondrie accumulerait les ions calciques, et de l'eau rentrerait pour réguler la pression osmotique : les vacuoles commencent à se former. La baisse des gradients ioniques ferait diminuer les courants synaptiques, donc expliquerait la baisse de l'excitabilité des motoneurones<sup>119</sup> et la diminution des PPSE. Il y aurait avec le temps un gain de synapses excitatrices<sup>128</sup> par compensation des faibles courants excitateurs. Enfin, l'altération serait plus forte dans les motoneurones FF (plus grosses vacuoles, excitabilité plus faible) que les motoneurones S, car les motoneurones FF nécessitent une plus grande quantité d'ATP pour maintenir les gradients ioniques<sup>181</sup>. L'hyperexcitabilité des motoneurones à un stade précoce, même si elle n'est pas délétère chez les jeunes souris, promouvrait alors la SLA, par une excitotoxicité d'origine calcique. De plus, le défaut de mitophagie et l'accumulation de ROS augmentant avec l'âge seraient des facteurs essentiels de la dégénérescence des motoneurones.



**Figure 37 : Hypothèse de la perte de l'homéostasie calcique menant à la dégénérescence des motoneurones. L'hyperexcitabilité transitoire ayant lieu chez la souris jeune déclenche une accumulation de ROS et une dégénérescence mitochondriale compensée chez le jeune mais qui entretient un cercle vicieux chez l'adulte.**

Nos travaux suggèrent qu'il n'y a pas d'excitotoxicité glutamatergique. En revanche, il est possible qu'une dérégulation de l'homéostasie calcique engendrerait des troubles métaboliques qui pourraient mener à la dégénérescence des motoneurones.

## **6 BIBLIOGRAPHIE**

---



1. Liddell, E. G. T. & Sherrington, C. S. Recruitment and some other Features of Reflex Inhibition. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **97**, 488-518 (1925).
2. Redfern, P. A. Neuromuscular transmission in new-born rats. *J. Physiol.* **209**, 701-709 (1970).
3. Van Essen, D. C., Gordon, H., Soha, J. M. & Fraser, S. E. Synaptic dynamics at the neuromuscular junction: mechanisms and models. *J. Neurobiol.* **21**, 223-249 (1990).
4. Manuel, M. & Zytnicki, D. Alpha, beta and gamma motoneurons: functional diversity in the motor system's final pathway. *J. Integr. Neurosci.* **10**, 243-276 (2011).
5. Burke, R. E., Levine, D. N. & Zajac, F. E. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* **174**, 709-712 (1971).
6. Burke, R. E., Levine, D. N., Tsairis, P. & Zajac, F. E. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol.* **234**, 723-748 (1973).
7. Mcphedran, A. M., Wuerker, R. B. & Henneman, E. PROPERTIES OF MOTOR UNITS IN A HETEROGENEOUS PALE MUSCLE (M. GASTROCNEMIUS) OF THE CAT. *J. Neurophysiol.* **28**, 85-99 (1965).
8. Mcphedran, A. M., Wuerker, R. B. & Henneman, E. PROPERTIES OF MOTOR UNITS IN A HOMOGENEOUS RED MUSCLE (SOLEUS) OF THE CAT. *J. Neurophysiol.* **28**, 71-84 (1965).
9. Hegedus, J., Putman, C. T. & Gordon, T. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **28**, 154-164 (2007).
10. Brooke, M. H. & Kaiser, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* **23**, 369-379 (1970).
11. Schiaffino, S. *et al.* Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibres. *Acta Physiol. Scand.* **134**, 575-576 (1988).
12. McCombe, P. A. & Henderson, R. D. Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend. Med.* **7**, 557-570 (2010).
13. Wohlfart, G. Clinical considerations on innervation of skeletal muscle. *Am. J. Phys. Med.* **38**, 223-230 (1959).
14. Swash, M. & Ingram, D. Preclinical and subclinical events in motor neuron disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **51**, 165-168 (1988).
15. Chen, S., Sayana, P., Zhang, X. & Le, W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol. Neurodegener.* **8**, 28 (2013).
16. Rosen, D. R. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **364**, 362 (1993).
17. Kabashi, E. *et al.* TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* **40**, 572-574 (2008).
18. Kwiatkowski, T. J. *et al.* Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16

- cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**, 1205–1208 (2009).
19. DeJesus-Hernandez, M. *et al.* Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* **72**, 245–256 (2011).
  20. Renton, A. E. *et al.* A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* **72**, 257–268 (2011).
  21. Pardo, C. A. *et al.* Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 954–958 (1995).
  22. Saccon, R. A., Bunton-Stasyshyn, R. K. A., Fisher, E. M. C. & Fratta, P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain J. Neurol.* **136**, 2342–2358 (2013).
  23. Shaw, I. C., Fitzmaurice, P. S., Mitchell, J. D. & Lynch, P. G. Studies on cellular free radical protection mechanisms in the anterior horn from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* **4**, 391–396 (1995).
  24. Shibata, N. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* **21**, 82–92 (2001).
  25. Cleveland, D. W. & Rothstein, J. D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 806–819 (2001).
  26. Gurney, M. E. *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772–1775 (1994).
  27. Özdinler, P. H. *et al.* Corticospinal Motor Neurons and Related Subcerebral Projection Neurons Undergo Early and Specific Neurodegeneration in hSOD1G93A Transgenic ALS Mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 4166–4177 (2011).
  28. Wong, P. C., Cai, H., Borchelt, D. R. & Price, D. L. Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* **5**, 633–639 (2002).
  29. Veldink, J. H. *et al.* Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul. Disord. NMD* **13**, 737–743 (2003).
  30. Wooley, C. M. *et al.* Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve* **32**, 43–50 (2005).
  31. Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L. & Caroni, P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat. Neurosci.* **9**, 408–419 (2006).
  32. Hegedus, J., Putman, C. T., Tyreman, N. & Gordon, T. Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol.* **586**, 3337–3351 (2008).
  33. Fischer, L. R. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy:

- evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* **185**, 232-240 (2004).
34. Kanning, K. C., Kaplan, A. & Henderson, C. E. Motor neuron diversity in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **33**, 409-440 (2010).
  35. Chiu, A. Y. *et al.* Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Cell. Neurosci.* **6**, 349-362 (1995).
  36. Ilieva, H., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J. Cell Biol.* **187**, 761-772 (2009).
  37. Bruijn, L. I. *et al.* Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* **281**, 1851-1854 (1998).
  38. Yoon, E. J. *et al.* Intracellular amyloid beta interacts with SOD1 and impairs the enzymatic activity of SOD1: implications for the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Mol. Med.* **41**, 611-617 (2009).
  39. Andrus, P. K., Fleck, T. J., Gurney, M. E. & Hall, E. D. Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **71**, 2041-2048 (1998).
  40. Bruijn, L. I. *et al.* Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant *in vivo* property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7606-7611 (1997).
  41. Beckman, J. S., Carson, M., Smith, C. D. & Koppenol, W. H. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* **364**, 584 (1993).
  42. Wiedau-Pazos, M. *et al.* Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **271**, 515-518 (1996).
  43. van der Blik, A. M., Shen, Q. & Kawajiri, S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
  44. Youle, R. J. & Karbowski, M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 657-663 (2005).
  45. Olichon, A. *et al.* The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* **523**, 171-176 (2002).
  46. Santel, A. & Fuller, M. T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* **114**, 867-874 (2001).
  47. Griffin, E. E., Detmer, S. A. & Chan, D. C. Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 482-489 (2006).
  48. Frezza, C. *et al.* OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177-189 (2006).
  49. Vande Velde, C. *et al.* Misfolded SOD1 Associated with Motor Neuron Mitochondria Alters Mitochondrial Shape and Distribution Prior to Clinical Onset. *PLoS ONE* **6**, (2011).

50. Natale, G. *et al.* Compartment-dependent mitochondrial alterations in experimental ALS, the effects of mitophagy and mitochondriogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).
51. Higgins, C. M. J., Jung, C. & Xu, Z. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci.* **4**, 16 (2003).
52. Greenwood, S. M., Mizielińska, S. M., Frenguelli, B. G., Harvey, J. & Connolly, C. N. Mitochondrial dysfunction and dendritic beading during neuronal toxicity. *J. Biol. Chem.* **282**, 26235–26244 (2007).
53. Magrané, J., Sahawneh, M. A., Przedborski, S., Estévez, Á. G. & Manfredi, G. Mitochondrial dynamics and bioenergetic dysfunction is associated with synaptic alterations in mutant SOD1 motor neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 229–242 (2012).
54. Magrané, J. *et al.* Mutant SOD1 in neuronal mitochondria causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4552–4564 (2009).
55. Magrané, J., Cortez, C., Gan, W.-B. & Manfredi, G. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 1413–1424 (2014).
56. Rizzardini, M. *et al.* Low levels of ALS-linked Cu/Zn superoxide dismutase increase the production of reactive oxygen species and cause mitochondrial damage and death in motor neuron-like cells. *J. Neurol. Sci.* **232**, 95–103 (2005).
57. Allen, S. P. *et al.* Superoxide dismutase 1 mutation in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis shifts energy generation from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Neurobiol. Aging* **35**, 1499–1509 (2014).
58. Lautenschläger, J. *et al.* Overexpression of human mutated G93A SOD1 changes dynamics of the ER mitochondria calcium cycle specifically in mouse embryonic motor neurons. *Exp. Neurol.* **247**, 91–100 (2013).
59. Moreau, B., Nelson, C. & Parekh, A. B. Biphasic regulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake by cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration. *Curr. Biol. CB* **16**, 1672–1677 (2006).
60. Jaiswal, M. K. Selective vulnerability of motoneuron and perturbed mitochondrial calcium homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: implications for motoneurons specific calcium dysregulation. *Mol. Cell. Ther.* **2**, (2014).
61. Martin, L. J. The mitochondrial permeability transition pore: a molecular target for amyotrophic lateral sclerosis therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 186–197 (2010).
62. Martin, L. J. *et al.* GNX-4728, a novel small molecule drug inhibitor of mitochondrial permeability transition, is therapeutic in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 433 (2014).
63. Parone, P. A. *et al.* Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without

- extending survival in mouse models of inherited ALS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 4657–4671 (2013).
64. Pedrini, S. *et al.* ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2974–2986 (2010).
65. Tafuri, F., Ronchi, D., Magri, F., Comi, G. P. & Corti, S. SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 336 (2015).
66. Pickles, S. *et al.* ALS-linked misfolded SOD1 species have divergent impacts on mitochondria. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 43 (2016).
67. Igoudjil, A. *et al.* In vivo pathogenic role of mutant SOD1 localized in the mitochondrial intermembrane space. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 15826–15837 (2011).
68. Ozcan, L. & Tabas, I. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disease and Other Disorders. *Annu. Rev. Med.* **63**, 317–328 (2012).
69. Atkin, J. D. *et al.* Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **30**, 400–407 (2008).
70. Chen, D., Wang, Y. & Chin, E. R. Activation of the endoplasmic reticulum stress response in skeletal muscle of G93A\*SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).
71. Kikuchi, H. *et al.* Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6025–6030 (2006).
72. Soo, K. Y. *et al.* Bim Links ER Stress and Apoptosis in Cells Expressing Mutant SOD1 Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* **7**, (2012).
73. Saxena, S., Cabuy, E. & Caroni, P. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat. Neurosci.* **12**, 627–636 (2009).
74. Oyanagi, K. *et al.* Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **34**, 650–658 (2008).
75. Sasaki, S. Endoplasmic Reticulum Stress in Motor Neurons of the Spinal Cord in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 346–355 (2010).
76. Grosskreutz, J., Van Den Bosch, L. & Keller, B. U. Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium* **47**, 165–174 (2010).
77. Tadic, V., Prell, T., Lautenschlaeger, J. & Grosskreutz, J. The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 147 (2014).
78. de Brito, O. M. & Scorrano, L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605–610 (2008).

79. Stoica, R. *et al.* ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat. Commun.* **5**, 3996 (2014).
80. Paillusson, S. *et al.* There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci.* **39**, 146–157 (2016).
81. Muñoz, J. P. *et al.* Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *EMBO J.* **32**, 2348–2361 (2013).
82. Gkogkas, C. *et al.* VAPB interacts with and modulates the activity of ATF6. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1517–1526 (2008).
83. Friedman, J. R., Webster, B. M., Mastronarde, D. N., Verhey, K. J. & Voeltz, G. K. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* **190**, 363–375 (2010).
84. Friedman, J. R. *et al.* ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**, 358–362 (2011).
85. Bernard-Marissal, N., Médard, J.-J., Azzedine, H. & Chrast, R. Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration. *Brain J. Neurol.* **138**, 875–890 (2015).
86. Nishimura, A. L. *et al.* A Mutation in the Vesicle-Trafficking Protein VAPB Causes Late-Onset Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 822–831 (2004).
87. Watanabe, S. *et al.* Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS. *EMBO Mol. Med.* **8**, 1421–1437 (2016).
88. Cipolat Mis, M. S., Brajkovic, S., Frattini, E., Di Fonzo, A. & Corti, S. Autophagy in motor neuron disease: Key pathogenetic mechanisms and therapeutic targets. *Mol. Cell. Neurosci.* **72**, 84–90 (2016).
89. Hadano, S. *et al.* Loss of ALS2/Alsin exacerbates motor dysfunction in a SOD1-expressing mouse ALS model by disturbing endolysosomal trafficking. *PLoS One* **5**, e9805 (2010).
90. Krasniak, C. S. & Ahmad, S. T. The role of CHMP2B(Intron5) in autophagy and frontotemporal dementia. *Brain Res.* **1649**, 151–157 (2016).
91. Münch, C. *et al.* Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology* **63**, 724–726 (2004).
92. Sasaki, S. Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**, 349–359 (2011).
93. Nassif, M. *et al.* Pathogenic role of BECN1/Beclin 1 in the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* **10**, 1256–1271 (2014).
94. Tokuda, E., Brännström, T., Andersen, P. M. & Marklund, S. L. Low autophagy capacity implicated in motor system vulnerability to mutant superoxide dismutase. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 6 (2016).
95. Xie, Y. *et al.* Endolysosomal Deficits Augment Mitochondria Pathology in

- Spinal Motor Neurons of Asymptomatic fALS Mice. *Neuron* **87**, 355-370 (2015).
96. Zhang, X. et al. mTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* **10**, 588-602 (2014).
97. Laforge, M. et al. NF- $\kappa$ B pathway controls mitochondrial dynamics. *Cell Death Differ.* **23**, 89-98 (2016).
98. Yung, C., Sha, D., Li, L. & Chin, L.-S. Parkin Protects Against Misfolded SOD1 Toxicity by Promoting Its Aggresome Formation and Autophagic Clearance. *Mol. Neurobiol.* **53**, 6270-6287 (2016).
99. Ikenaka, K. et al. Disruption of Axonal Transport in Motor Neuron Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 1225-1238 (2012).
100. Hafezparast, M. et al. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* **300**, 808-812 (2003).
101. Clark, J. A., Yeaman, E. J., Blizzard, C. A., Chuckowree, J. A. & Dickson, T. C. A Case for Microtubule Vulnerability in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Altered Dynamics During Disease. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, 204 (2016).
102. Zhang, F. et al. Interaction between familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked SOD1 mutants and the dynein complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 16691-16699 (2007).
103. Park, J. Y. et al. Mitochondrial swelling and microtubule depolymerization are associated with energy depletion in axon degeneration. *Neuroscience* **238**, 258-269 (2013).
104. Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P. N. & Shaw, P. J. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* **57**, 1251-1264 (2009).
105. Henkel, J. S., Beers, D. R., Zhao, W. & Appel, S. H. Microglia in ALS: The Good, The Bad, and The Resting. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **4**, 389-398 (2009).
106. Valori, C. F., Brambilla, L., Martorana, F. & Rossi, D. The multifaceted role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **71**, 287-297 (2014).
107. Yamanaka, K. & Yamashita, H. [ALS and microglia--a player for non-cell-autonomous neuron death]. *Brain Nerve Shinkei Kenkyu No Shinpo* **59**, 1163-1170 (2007).
108. Howland, D. S. et al. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1604-1609 (2002).
109. Philips, T. & Rothstein, J. D. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **69**, 5.67.1-21 (2015).
110. Schuster, J. E., Fu, R., Siddique, T. & Heckman, C. J. Effect of prolonged riluzole exposure on cultured motoneurons in a mouse model of ALS. *J. Neurophysiol.* **107**, 484-492 (2012).
111. Menon, P. et al. Sensitivity and specificity of threshold tracking transcranial

- magnetic stimulation for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *Lancet Neurol.* **14**, 478-484 (2015).
112. Barbeito, L. H. *et al.* A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **47**, 263-274 (2004).
113. Vanselow, B. K. & Keller, B. U. Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *J. Physiol.* **525 Pt 2**, 433-445 (2000).
114. Kuo, J. J., Siddique, T., Fu, R. & Heckman, C. J. Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J. Physiol.* **563**, 843-854 (2005).
115. van Zundert, B. *et al.* Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 10864-10874 (2008).
116. Martin, E., Cazenave, W., Cattaert, D. & Branchereau, P. Embryonic alteration of motoneuronal morphology induces hyperexcitability in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **54**, 116-126 (2013).
117. Leroy, F., Lamotte d'Incamps, B., Imhoff-Manuel, R. D. & Zytnicki, D. Early intrinsic hyperexcitability does not contribute to motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *eLife* **3**,
118. Manuel, M. *et al.* Fast kinetics, high-frequency oscillations, and subprimary firing range in adult mouse spinal motoneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 11246-11256 (2009).
119. Delestrée, N. *et al.* Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol.* **592**, 1687-1703 (2014).
120. Hadzipasic, M. *et al.* Selective degeneration of a physiological subtype of spinal motor neuron in mice with SOD1-linked ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 16883-16888 (2014).
121. Wainger, B. J. *et al.* Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep.* **7**, 1-11 (2014).
122. Devlin, A.-C. *et al.* Human iPSC-derived motoneurons harbouring TARDBP or C9ORF72 ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability. *Nat. Commun.* **6**, 5999 (2015).
123. Sareen, D. *et al.* Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. *Sci. Transl. Med.* **5**, 208ra149 (2013).
124. Naujock, M. *et al.* 4-Aminopyridine Induced Activity Rescues Hypoexcitable Motor Neurons from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **34**, 1563-1575 (2016).
125. ElBasiouny, S. M., Schuster, J. E. & Heckman, C. J. Persistent inward currents in spinal motoneurons: important for normal function but potentially harmful after



- spinal cord injury and in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* **121**, 1669–1679 (2010).
126. Quinlan, K. A., Schuster, J. E., Fu, R., Siddique, T. & Heckman, C. J. Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol.* **589**, 2245–2260 (2011).
127. Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Mercuri, N. B. & Zona, C. Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **215**, 368–379 (2009).
128. Sunico, C. R. *et al.* Reduction in the motoneuron inhibitory/excitatory synaptic ratio in an early-symptomatic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **21**, 1–15 (2011).
129. Chang, Q. & Martin, L. J. Glycinergic innervation of motoneurons is deficient in amyotrophic lateral sclerosis mice: a quantitative confocal analysis. *Am. J. Pathol.* **174**, 574–585 (2009).
130. Burke, R. E. & Glenn, L. L. Horseradish peroxidase study of the spatial and electrotonic distribution of group Ia synapses on type-identified ankle extensor motoneurons in the cat. *J. Comp. Neurol.* **372**, 465–485 (1996).
131. Fyffe, R. E. Spatial distribution of recurrent inhibitory synapses on spinal motoneurons in the cat. *J. Neurophysiol.* **65**, 1134–1149 (1991).
132. Iglesias, C. *et al.* Electrophysiological and spinal imaging evidences for sensory dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open* **5**, e007659 (2015).
133. Sangari, S. *et al.* Impairment of sensory-motor integration at spinal level in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* **127**, 1968–1977 (2016).
134. Saba, L. *et al.* Altered Functionality, Morphology, and Vesicular Glutamate Transporter Expression of Cortical Motor Neurons from a Presymptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* (2015). doi:10.1093/cercor/bhu317
135. Jiang, M., Schuster, J. E., Fu, R., Siddique, T. & Heckman, C. J. Progressive changes in synaptic inputs to motoneurons in adult sacral spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 15031–15038 (2009).
136. McGown, A. *et al.* Early interneuron dysfunction in ALS: insights from a mutant sod1 zebrafish model. *Ann. Neurol.* **73**, 246–258 (2013).
137. Martin, L. J. & Chang, Q. Inhibitory synaptic regulation of motoneurons: a new target of disease mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurobiol.* **45**, 30–42 (2012).
138. Ikegaya, Y. *et al.* Rapid and reversible changes in dendrite morphology and synaptic efficacy following NMDA receptor activation: implication for a cellular defense against excitotoxicity. *J. Cell Sci.* **114**, 4083–4093 (2001).
139. Chang, D. T. W. & Reynolds, I. J. Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons. *Prog. Neurobiol.* **80**, 241–268 (2006).

140. Sharma, A. *et al.* ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nat. Commun.* **7**, 10465 (2016).
141. Kamelgarn, M. *et al.* Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS. *Biochim. Biophys. Acta* **1862**, 2004–2014 (2016).
142. Shaw, P. J. & Ince, P. G. Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* **244**, S3–S14 (1997).
143. Wang, Z., Li, L., Goulding, M. & Frank, E. Early postnatal development of reciprocal Ia inhibition in the murine spinal cord. *J. Neurophysiol.* **100**, 185–196 (2008).
144. Wang, W. *et al.* The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 4706–4719 (2013).
145. Onesto, E. *et al.* Gene-specific mitochondria dysfunctions in human TARDBP and C9ORF72 fibroblasts. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, (2016).
146. Kaus, A. & Sareen, D. ALS Patient Stem Cells for Unveiling Disease Signatures of Motoneuron Susceptibility: Perspectives on the Deadly Mitochondria, ER Stress and Calcium Triad. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).
147. Stoica, R. *et al.* ALS/FTD-associated FUS activates GSK-3 $\beta$  to disrupt the VAPB-PTPIP51 interaction and ER-mitochondria associations. *EMBO Rep.* **17**, 1326–1342 (2016).
148. Deng, J. *et al.* FUS Interacts with HSP60 to Promote Mitochondrial Damage. *PLoS Genet.* **11**, e1005357 (2015).
149. Choi, D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* **7**, 369–379 (1987).
150. Ruegsegger, C. *et al.* Aberrant association of misfolded SOD1 with Na(+)/K(+)ATPase- $\alpha$ 3 impairs its activity and contributes to motor neuron vulnerability in ALS. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **131**, 427–451 (2016).
151. Fuchs, A. *et al.* Downregulation of the Potassium Chloride Cotransporter KCC2 in Vulnerable Motoneurons in the SOD1-G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 1057–1070 (2010).
152. Akita, T. & Okada, Y. Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system. *Neuroscience* **275**, 211–231 (2014).
153. Shen, M. *et al.* Activation of volume-sensitive outwardly rectifying chloride channel by ROS contributes to ER stress and cardiac contractile dysfunction: involvement of CHOP through Wnt. *Cell Death Dis.* **5**, e1528 (2014).
154. Inoue, H. & Okada, Y. Roles of volume-sensitive chloride channel in excitotoxic neuronal injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 1445–1455 (2007).
155. Crofts, A. R. & Chappell, J. B. CALCIUM ION ACCUMULATION AND VOLUME CHANGES OF ISOLATED LIVER MITOCHONDRIA. REVERSAL OF

- CALCIUM ION-INDUCED SWELLING. *Biochem. J.* **95**, 387-392 (1965).
156. Calamita, G., Gena, P., Meleleo, D., Ferri, D. & Svelto, M. Water permeability of rat liver mitochondria: A biophysical study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1758**, 1018-1024 (2006).
157. Lee, W.-K. & Thévenod, F. A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions? *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **291**, C195-C202 (2006).
158. Sugiura, A., Mattie, S., Prudent, J. & McBride, H. M. Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature* **542**, 251-254 (2017).
159. Honsho, M., Yamashita, S. & Fujiki, Y. Peroxisome homeostasis: Mechanisms of division and selective degradation of peroxisomes in mammals. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1863**, 984-991 (2016).
160. Ilieva, H. S. *et al.* Age-related changes in peroxisomal membrane protein 70 and superoxide dismutase 1 in transgenic G93A mice. *Neurol. Res.* **25**, 423-426 (2003).
161. Thau, N. *et al.* Decreased mRNA expression of PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$ -regulated factors in the SOD1G93A ALS mouse model and in human sporadic ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **71**, 1064-1074 (2012).
162. Qi, Y. *et al.* Differential peroxisome proliferator activated receptors activity in a rodent model of amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 3743-3751 (2015).
163. Schrader, M., Costello, J., Godinho, L. F. & Islinger, M. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **38**, 681-702 (2015).
164. Benedusi, V., Martorana, F., Brambilla, L., Maggi, A. & Rossi, D. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) controls natural protective mechanisms against lipid peroxidation in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **287**, 35899-35911 (2012).
165. Kiaei, M., Kipiani, K., Chen, J., Calingasan, N. Y. & Beal, M. F. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist extends survival in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **191**, 331-336 (2005).
166. Song, W., Song, Y., Kincaid, B., Bossy, B. & Bossy-Wetzell, E. Mutant SOD1G93A triggers mitochondrial fragmentation in spinal cord motor neurons: neuroprotection by SIRT3 and PGC-1 $\alpha$ . *Neurobiol. Dis.* **51**, 72-81 (2013).
167. Zhao, W. *et al.* Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1alpha (PGC-1 $\alpha$ ) improves motor performance and survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.* **6**, 51 (2011).
168. Qi, Y. *et al.* PGC-1 $\alpha$  Silencing Compounds the Perturbation of Mitochondrial Function Caused by Mutant SOD1 in Skeletal Muscle of ALS Mouse Model. *Front. Aging Neurosci.* **7**, 204 (2015).
169. Dimitrov, L., Lam, S. K. & Schekman, R. The Role of the Endoplasmic Reticulum in Peroxisome Biogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
170. Tabak, H. F., Braakman, I. & van der Zand, A. Peroxisome formation and

maintenance are dependent on the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 723-744 (2013).

171. van der Zand, A., Gent, J., Braakman, I. & Tabak, H. F. Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* **149**, 397-409 (2012).

172. Wilson, M. H. & Deschenes, M. R. The neuromuscular junction: anatomical features and adaptations to various forms of increased, or decreased neuromuscular activity. *Int. J. Neurosci.* **115**, 803-828 (2005).

173. Chang, Q. & Martin, L. J. Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 2815-2827 (2011).

174. Carunchio, I., Mollinari, C., Pieri, M., Merlo, D. & Zona, C. GAB(A) receptors present higher affinity and modified subunit composition in spinal motor neurons from a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 1275-1285 (2008).

175. Calvo-Gallardo, E. *et al.* Depressed excitability and ion currents linked to slow exocytotic fusion pore in chromaffin cells of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **308**, C1-C19 (2015).

176. Saxena, S. *et al.* Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival. *Neuron* **80**, 80-96 (2013).

177. Carriedo, S. G., Sensi, S. L., Yin, H. Z. & Weiss, J. H. AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 240-250 (2000).

178. Tran, L. T., Gentil, B. J., Sullivan, K. E. & Durham, H. D. The voltage-gated calcium channel blocker lomerizine is neuroprotective in motor neurons expressing mutant SOD1, but not TDP-43. *J. Neurochem.* **130**, 455-466 (2014).

179. Damiano, M. *et al.* Neural mitochondrial Ca<sup>2+</sup> capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J. Neurochem.* **96**, 1349-1361 (2006).

180. Tateno, M. *et al.* Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2183-2196 (2004).

181. Le Masson, G., Przedborski, S. & Abbott, L. F. A computational model of motor neuron degeneration. *Neuron* **83**, 975-988 (2014).

## **Altération des entrées synaptiques et origine de la vacuolisation dans les motoneurones de souris SOD1<sup>G93A</sup>, modèle de la Sclérose Latérale Amyotrophique**

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative au cours de laquelle les motoneurones meurent. Le premier dysfonctionnement des motoneurones est la rétractation de leurs jonctions neuromusculaires. La présence de vacuoles a été décrite dans l'axone et les dendrites des motoneurones avant la dénervation dans les souris SOD1<sup>G93A</sup>, modèle murin de la maladie. L'origine des vacuoles n'est pas connue. On peut toutefois se demander si elle pourrait résulter d'un stress excitotoxique.

L'excitotoxicité pourrait provenir soit d'une hyperexcitabilité intrinsèque du motoneurone, soit d'une hyperexcitation (balance des entrées excitatrices et inhibitrices modifiées au profit d'une plus grande excitation). Or il a été montré que si les motoneurones sont hyperexcitables au stade embryonnaire dans les souris SOD1<sup>G93A</sup>, seuls les motoneurones résistants à la SLA (type S) sont hyperexcitables à la deuxième semaine postnatale tandis que les motoneurones vulnérables (types FF et FR) deviennent hypoexcitables avant leur dégénérescence chez l'adulte. Nous avons donc étudié les entrées synaptiques reçues par les motoneurones, pour savoir si la balance excitation/inhibition est déplacée et s'ils sont ainsi hyperexcités.

Pour cela nous avons réalisé des enregistrements électrophysiologiques de motoneurones lors de la stimulation de circuits pré-moteurs, et des marquages intracellulaires de motoneurones combinés avec des marquages immunohistochimiques des boutons VGlut1, VGlut2 et Vgat. Nous avons montré que l'amplitude des PPSE monosynaptiques la était diminuée dans les souris SOD1, les PPSI di- et trisynaptiques étaient moins nombreux et les interneurones inhibiteurs moins excitables. Cette modification des entrées synaptiques n'était pas due à un changement du nombre de synapses. En revanche, les synapses sont particulièrement nombreuses aux domaines dendritiques qui se vacuolisent dans les souris SOD1, suggérant un lien entre l'activité synaptique et la vacuolisation.

Des marquages intracellulaires de motoneurones de souris SOD1, montrent que les vacuoles grandissent avec l'évolution de la maladie, suggérant leur implication dans le processus de dégénération. Grâce à des révélations immunohistochimiques, nous avons montré que ces vacuoles apparaissent dans l'espace intermitochondrial lors de la dégénérescence des mitochondries. Le réticulum endoplasmique est également impliqué. Enfin, l'autophagie, mécanisme d'élimination des organites cellulaires, est déficient au moment de l'apparition des vacuoles, expliquant pourquoi elles s'accumulent avec le temps.

Ces résultats amènent à reconsidérer l'hypothèse de l'excitotoxicité supposée comme mécanisme à l'origine de la mort des motoneurones.