



HAL
open science

Modélisation et analyses physiopathologiques de la Sclérose Latérale Amyotrophique liée à l'ubiquiline 2 à l'aide de vecteurs AAV10

Corinne Bos

► **To cite this version:**

Corinne Bos. Modélisation et analyses physiopathologiques de la Sclérose Latérale Amyotrophique liée à l'ubiquiline 2 à l'aide de vecteurs AAV10. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066223 . tel-02332677

HAL Id: tel-02332677

<https://theses.hal.science/tel-02332677>

Submitted on 25 Oct 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 Pierre et Marie Curie

ED 515 : Complexité du vivant

Institut de Myologie, UMRS 974 « Thérapie des maladies du muscle strié »

Equipe 6 : « Transfert de gènes dans le Système Nerveux Central et Biothérapie des maladies du motoneurone »

Modélisation et analyses physiopathologiques de la Sclérose Latérale Amyotrophique liée à l'ubiquiline 2 à l'aide de vecteurs AAV10

Par Corinne BOS

Thèse de doctorat : Neurosciences

Dirigée par Martine BARKATS

Présentée et soutenue publiquement le 23 octobre 2017

Devant un jury composé de :

Mr FRIGUET Bertrand	Professeur des Universités	Président
Mr RAOUL Cédric	Directeur de Recherche	Rapporteur
Mme BLASCO-RESPAUD Hélène	Maitre de Conférence-Praticien Hospitalier	Rapporteur
Mme BOHL Delphine	Chargé de Recherche	Examineur
Mme PERRIN Florence	Professeur des Universités	Examineur
Mme BUTLER-BROWNE Gillian	Directeur de Recherche	Remplaçant du directeur de thèse
Mme BIFERI Maria-Grazia	Chargé de Recherche	Co-encadrant

REMERCIEMENTS

Je remercie, tout d'abord, les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail : Cédric RAOUL et Hélène BLASCO-RESPAUD en tant que rapporteur, Bertrand FRIGUET en tant que président du jury ainsi que Delphine BOHL et Florence PERRIN en tant qu'examinateur.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Martine BARKATS pour m'avoir accueillie au sein de son équipe du Centre de Recherche en Myologie, ainsi que pour son enseignement, le partage de ces connaissances et de son expérience.

Je remercie Gillian BUTLER-BROWNE pour avoir accepté de remplacer Martine durant son congé maladie et pour sa disponibilité.

Je tiens à remercier profondément Maria-Grazia BIFERI pour m'avoir guidée durant ces trois années de thèse, pour son enseignement, sa patience, sa disponibilité, ses conseils scientifiques, sa formation d'un point de vue technique et pour m'avoir fait confiance. Je la remercie aussi pour m'avoir toujours soutenue et encouragée dans mon travail.

Un grand merci à Mathilde pour son aide à chaque fois que j'en avais besoin et pour sa disponibilité.

Je tiens également à remercier Stéphanie, Yannick, Thibault, Aurore, Jordan, Nathalie, Benoit, Marianne, Laetitia pour m'avoir aidée dans la réalisation de certaines manipulations, d'avoir pris du temps pour répondre à mes questions, pour tous les conseils que vous m'avez donnés, vos encouragements et votre soutien.

Je remercie encore une fois Maria-Grazia, Gillian, Mathilde, Stéphanie et Aurore pour leurs conseils et surtout pour le temps qu'elles ont consacré à la relecture du manuscrit.

De manière générale, je remercie toutes ces personnes qui forment une super équipe où il y a toujours eu de l'ambiance, de la bonne humeur et de bonnes rigolades.

Merci à toutes les autres personnes que je n'ai pas citées mais que j'ai eu le plaisir de rencontrer.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenue durant toutes ces années d'études, sans lesquels je ne serai pas arrivée jusque là aujourd'hui.

SOMMAIRE

RESUME	1
ABSTRACT	2
TABLE DES FIGURES	3
TABLE DES TABLEAUX	5
ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	10
1 La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)	11
1.1 Présentation générale de la maladie.....	11
1.1.1 Historique et description de la SLA	11
1.1.2 Fréquence et répartition de la maladie.....	13
1.1.3 Manifestations cliniques de la SLA	13
1.1.4 Diagnostic et pronostic.....	14
1.2 Les différentes formes de SLA	16
1.2.1 Les formes sporadiques et familiales de la SLA.....	16
1.2.2 La SLA avec Démence Fronto-Temporale (DFT)	18
1.3 Génétique de la SLA et mécanismes pathologiques	20
1.3.1 La SLA liée à <i>SOD1</i> (ALS 1)	21
1.3.2 La SLA liée à <i>TARDBP</i> (ALS 10)	25
1.3.3 La SLA liée à <i>FUS</i> (ALS 6)	29
1.3.4 La SLA liée à l' <i>OPTN</i> (ALS 12)	31
1.3.5 La SLA liée à l' <i>UBQLN2</i> (ALS 15).....	32
1.3.6 La SLA liée à <i>C9ORF72</i> (FTDALS 1)	32
1.3.7 La SLA liée à <i>SQSTM1</i> (FTDALS 3)	37
1.3.8 La SLA liée à l' <i>UBQLN4</i>	38
2 La SLA liée à l' <i>UBQLN2</i>	39
2.1 L'ubiquiline 2	39
2.1.1 Le gène <i>UBQLN2</i> et la protéine ubiquiline 2.....	39
2.1.2 Localisation cellulaire	39
2.1.3 Expression tissulaire	40
2.1.4 Structure.....	40
2.2 Les fonctions de l'ubiquiline 2	43
2.2.1 Rôle de l'ubiquiline 2 dans le Système Ubiquitine-Protéasome (SUP).....	43
2.2.2 Rôle de l'ubiquiline 2 dans l'autophagie	44
2.3 La SLA liée aux mutations dans le gène <i>UBQLN2</i>	47
2.3.1 Les mutations de l' <i>UBQLN2</i> dans la SLA.....	47

2.3.2	Les caractéristiques physiopathologiques de la SLA liée à l' <i>UBQLN2</i>	48
2.3.3	Les modèles animaux de la SLA liée aux mutations de l' <i>UBQLN2</i>	52
3	Traitements et thérapie génique pour la SLA.....	60
3.1	Stratégies pharmacologiques pour la SLA	60
3.1.1	Stratégies ciblant l'excitotoxicité	60
3.1.2	Stratégies thérapeutiques ciblant le stress oxydatif	61
3.1.3	Stratégies thérapeutiques ciblant la neuroinflammation	62
3.1.4	Stratégies thérapeutiques ciblant la dégradation des protéines	62
3.1.5	Stratégies thérapeutiques visant les dysfonctionnements mitochondriaux	63
3.1.6	Stratégies thérapeutiques visant l'apoptose dans la SLA.....	64
3.1.7	Stratégies thérapeutiques via les facteurs neurotrophiques	64
3.2	Stratégies thérapeutiques non pharmacologiques	65
3.2.1	Thérapie par cellules souches	65
3.2.2	Thérapie génique.....	66
4	Les Adeno-Associated Virus (AAV) pour le transfert de gènes	67
4.1	Biologie de l'AAV	67
4.2	Les sérotypes	69
4.3	Le cycle viral réplcatif	69
4.4	Les AAV recombinants.....	71
4.5	Développement de vecteurs AAVr double brin	72
5	Modèles animaux pour les maladies neurodégénératives via les AAV.....	73
5.1	Avantages des vecteurs AAVr pour la modélisation animale.....	73
5.2	Modèles animaux pour les maladies neurodégénératives via les AAVr	73
5.2.1	Modèle murin pour la SLA-DFT liée à <i>C9ORF72</i>	73
5.2.2	Modèle de rat surexprimant p62	74
5.2.3	Modèles murins pour la SLA-DFT liée à l' <i>UBQLN2</i>	75
5.2.4	Modèle porcin pour l'amyotrophie spinale (SMA).....	76
	OBJECTIFS	78
	MATERIELS ET METHODES	82
1	Plasmides et clonage	83
2	Culture cellulaire, transfection et analyses	84
2.1	Lignées cellulaires.....	84
2.2	Transfection.....	84
2.3	Immunofluorescence sur cellules.....	84
3	Production de vecteurs AAVr	85
4	Expérimentations animales	85
4.1	Lignée murine	85

4.2 Injections d'AAVr.....	85
4.3 Injection du bleu de méthylène (BM).....	86
5 Histologie.....	86
5.1 Immunofluorescence sur tissus.....	86
5.2 Coloration des fibres oxydatives.....	87
5.3 Analyses histopathologiques au microscope.....	87
5.4 Stéréologie.....	88
6 Analyses protéiques.....	88
6.1 Western blot.....	88
6.2 Co-immunoprécipitation.....	89
6.3 Spectrométrie de masse.....	89
7 Analyses phénotypiques et comportementales.....	90
7.1 Survie et poids.....	90
7.2 Masse musculaire.....	90
7.3 Analyse des propriétés contractiles du muscle.....	90
7.4 Test d'agrippement.....	91
7.5 Analyse de la marche (footprint test).....	91
7.6 Test d'anxiété clair/obscur.....	92
7.7 Phénotypes de "clasping" et "spinning" (test de suspension par la queue).....	92
8 Tissus humains.....	93
9 Analyses statistiques.....	93
RESULTATS	94
1 Génération d'un modèle murin de la SLA-UBQLN2 par surexpression de l'ubiquiline 2 humaine mutée.....	95
1.1 L'expression de l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée <i>in vitro</i> conduit à la formation d'agrégats.....	95
1.2 La transfection des plasmides AAV-Ub2 ou AAV-Ub2Mut dans les cellules NSC-34 conduit à l'expression de l'ubiquiline 2 humaine.....	97
1.3 Production et injection des vecteurs AAV10 dans les ventricules cérébraux de souris nouveau-nées sauvages pour la génération du modèle animal.....	99
1.4 L'injection de l'AAV10-GFP par voie ICV permet l'expression de la GFP dans le SNC et le muscle squelettique des souris sauvages.....	100
2 Caractérisation physiopathologique du modèle murin de la SLA-UBQLN2.....	102
2.1 L'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit l'expression de l'ubiquiline 2 dans le cerveau et la moelle épinière des souris sauvages.....	103
2.2 L'injection d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV réduit la durée de vie et le poids des souris sauvages.....	104
2.3 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit la formation d'agrégats dans le cerveau et la moelle épinière des souris sauvages.....	106

2.4 Les agrégats formés, suite à l'injection ICV d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut dans le cerveau et la moelle épinière des souris sauvages, sont positifs pour les protéines p62 et ubiquitine	109
2.5 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit une réduction du volume cérébral et une astroglie dans le cerveau des souris sauvages	114
2.6 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit la perte des MNs et une astroglie dans la moelle épinière des souris sauvages	116
2.7 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit une perte de la masse et une atrophie musculaires des souris sauvages	118
2.8 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit une réduction de la force musculaire des souris sauvages	120
2.9 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit des troubles moteurs chez les souris sauvages.....	122
2.10 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit des signes d'anxiété chez les souris sauvages.....	123
2.11 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit des troubles neurologiques chez les souris sauvages	124
3 Etude <i>in vivo</i> des interactions de l'ubiquiline 2 mutée avec d'autres protéines par spectrométrie de masse.....	126
3.1 La surexpression d'ubiquiline 2 mutée <i>in vivo</i> induit une augmentation de son interaction avec des sous-unités du protéasome	126
3.2 La surexpression d'ubiquiline 2 mutée induit une perte de son interaction avec l' α -spectrine <i>in vivo</i>	130
3.3 La surexpression d'ubiquiline 2 mutée induit une accumulation de l' α -spectrine dans des lignées cellulaires	131
3.4 Les niveaux protéiques de l' α -spectrine sont modifiés dans les extraits de cerveaux de patients atteints de SLA sporadique.....	132
4 Test d'un traitement au bleu de méthylène sur le modèle murin de la SLA-UBQLN2.....	134
4.1 Le traitement au BM réduit les agrégats d'ubiquiline 2 dans la moelle épinière des souris injectées avec l'AAV10-Ub2, mais les augmente chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut	134
Etude de l'effet d'un nouveau traitement pour la SLA liée aux mutations de SOD1 sur les jonctions neuromusculaires des souris SOD1^{G93A}	136
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	138
1) Transfert de gène à l'aide de vecteurs AAV pour la génération de modèles animaux.....	140
2) Caractéristiques des modèles de souris surexprimant la forme sauvage ou mutée de l'ubiquiline 2 humaine.....	142
3) Intérêt du modèle surexprimant l'ubiquiline 2 humaine mutée par rapport aux modèles existants	145
4) Absence de « pathologie TDP-43 » dans le modèle surexprimant l'ubiquiline 2 humaine mutée.	146
5) Investigation du mécanisme pathologique de l'ubiquiline 2: gain de fonction et perte de fonction	147

6) Administration du BM chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée comme paradigme pour le test de thérapies.....	149
7) Conclusions et perspectives	151

BIBLIOGRAPHIE	153
----------------------	------------

ANNEXE	177
---------------	------------

RESUME

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative incurable caractérisée par la perte progressive des motoneurones (MNs) au niveau du cortex moteur primaire, du tronc cérébral et de la moelle épinière. Environ 10% des cas de SLA sont de forme familiale (SLAf) à transmission autosomique dominante, et à ce jour, plusieurs gènes ont été associés à la SLAf. Récemment, des mutations dans le gène *UBQLN2*, codant pour l'ubiquiline 2, ont été identifiées dans des formes héréditaires de SLA et de SLA avec Démence Fronto-Temporale (SLA-DFT). Ces mutations induisent la formation d'agrégats protéiques dans la moelle épinière de patients atteints de SLA, ainsi que dans le cerveau de patients atteints de SLA-DFT. De façon intéressante, ces agrégats positifs à l'ubiquiline 2, ont également été retrouvés dans d'autres formes familiales ainsi que dans des formes sporadiques de SLA et de SLA-DFT. En raison de l'implication de l'ubiquiline 2 dans les voies assurant la dégradation et le recyclage des protéines ubiquitinylées, essentielles pour la protéostasie et la survie cellulaire, son rôle semble être déterminant dans la pathogénèse des différents types de SLA.

Pour étudier les mécanismes physiopathologiques de la maladie et envisager des solutions thérapeutiques, nous avons créé un modèle murin de SLA et de SLA-DFT liées à l'*UBQLN2* par le transfert de gène via un vecteur viral associé à l'adénovirus (AAV). Plus précisément, nous avons généré deux lignées de souris exprimant soit l'ubiquiline 2 humaine sauvage, soit la forme humaine contenant la mutation P497H, par l'injection intracérébroventriculaire (ICV) d'un vecteur AAV10. Les souris modèles ont récapitulé l'ensemble des caractéristiques associées à la maladie ; à savoir la présence d'inclusions d'ubiquiline 2 dans la moelle épinière et dans le cerveau, une neuroinflammation, la dégénérescence des MNs, une atrophie et une faiblesse musculaire, des troubles cognitifs ainsi qu'une mort prématurée des souris exprimant la mutation.

De plus, par analyse de spectrométrie de masse, nous avons mis en évidence la perte d'interaction de l'ubiquiline 2 mutée avec une protéine indispensable pour le maintien du cytosquelette des neurones, l' α -spectrine.

Comme étape finale de validation de notre modèle, nous avons étudié l'effet du Bleu de Méthylène (BM), reconnu pour éliminer les agrégats protéiques toxiques. Le BM s'est révélé efficace pour réduire le nombre d'agrégats induits par la surexpression de la forme sauvage de l'ubiquiline 2. Paradoxalement, le BM a augmenté la quantité d'inclusions engendrées par la surexpression de l'ubiquiline 2 mutée.

Cette étude a donc permis d'obtenir un paradigme solide pour l'étude de l'implication de l'ubiquiline 2 dans la SLA ; et en perspective, pour comprendre les mécanismes d'agrégation protéique associés aux maladies neurodégénératives. Ce travail représente ainsi une première étape pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques efficaces pour les formes familiales et sporadiques de la pathologie.

Mots clés : SLA, ubiquiline 2, modèle murin, AAV10, ICV.

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is an incurable neurodegenerative disease characterized by progressive loss of motor neurons (MNs) in the primary motor cortex, brain stem and spinal cord. Approximately 10% of ALS cases are familial forms (fALS) with autosomal transmission, and to date different genes have been associated with fALS. Recently, mutations in the *UBQLN2* gene, encoding ubiquilin 2, have been identified in hereditary forms of ALS and ALS with FrontoTemporal Dementia (ALS-FTD). These mutations induce the formation of protein aggregates in the spinal cord of patients with ALS and in the brain of patients with ALS-FTD. Interestingly, these ubiquilin 2-positive aggregates have also been found in other familial forms as well as in sporadic forms of ALS and ALS-FTD. The role of ubiquilin 2 seems to be crucial in the pathogenesis of the different types of ALS, due to its involvement in proteostasis.

To understand the physiopathology of the disease and to envision therapeutic strategies, we have generated an ubiquilin 2-linked ALS and ALS-FTD mouse model using Adeno Associated Virus (AAV) vectors. Specifically, we have generated two mouse lines expressing either the wild-type human ubiquilin 2 or the mutant form carrying the P497H mutation, by intracerebroventricular (ICV) injection of an AAV10. Injected mice recapitulated disease associated phenotypes; namely the presence of ubiquilin 2 inclusions in brain and spinal cord, neuroinflammation, MNs degeneration, skeletal muscle atrophy and weakness, cognitive impairment. Premature death was also observed in mice overexpressing the mutant ubiquilin 2.

Furthermore, mass spectrometry analysis revealed a loss of interaction between the mutant protein and one protein necessary for cytoskeleton maintenance of neurons, the α -spectrin.

As last validation step of our model, we studied the effect of Methylene Blue (MB), known to eliminate toxic protein aggregates. MB reduced the number of aggregates induced by the overexpression of the wild-type ubiquilin 2. Surprisingly, MB treatment increased the number of inclusions in mice expressing the mutant ubiquilin 2.

In conclusion, this study presents a solid paradigm to study the involvement of ubiquilin 2 in ALS, and in perspective to understand protein aggregation mechanisms underlying neurodegenerative diseases. This work is a first step for the development of effective therapeutic strategies for familial and sporadic forms of ALS.

Key words : ALS, ubiquilin 2, murine model, AAV10, ICV.

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Localisation des motoneurones centraux et périphériques dans le système nerveux central (SNC).....	12
Figure 2: Chevauchements clinique, génétique et pathologique de la SLA (ALS) et de la DFT (FTD). ..	19
Figure 3: Graphique représentant les principaux gènes associés à la SLA, identifiés depuis 1993.	21
Figure 4: Hypothèses sur le rôle toxique de la protéine SOD1 mutée.....	23
Figure 5: Représentation schématique des gènes et des mécanismes conduisant à la protéinopathie TDP-43 et l'implication de celle-ci dans la pathogénèse de la SLA.	26
Figure 6: Représentation schématique des fonctions physiologiques de FUS.	30
Figure 7: Représentation schématique des structures secondaires et tertiaires perturbant la transcription du gène <i>C9ORF72</i>	34
Figure 8: Représentation schématique de la protéine p62.	37
Figure 9: Représentation schématique du gène <i>UBQLN2</i> et de la protéine ubiquiline 2 humaine.....	41
Figure 10: Représentations schématiques de la structure et du mécanisme de liaison des hélices de polyproline de type II (PPII) et des domaines SH3.	42
Figure 11: Représentation schématique de la prise en charge et de la dégradation des protéines mal repliées par le Système Ubiquitine-Protéasome (SUP).....	43
Figure 12: Le système protéolytique.....	46
Figure 13: Représentation schématique de l'implication de l'ubiquiline 2 dans la voie macroautophagique et la voie de Dégradation des protéines Associées au Réticulum Endoplasmique (DARE).....	47
Figure 14: Schéma représentatif des mutations de l'ubiquiline 2 identifiées chez des patients atteints	48
Figure 15: Photos représentatives de l'atteinte de la moelle épinière dans la SLA liée à l' <i>UBQLN2</i>	49
Figure 16: Photos représentatives de la formation d'inclusions "skein-like" localisées dans les neurones de moelle épinière chez un patient atteint de SLA liée à l'ubiquiline 2 ^{P506T}	50
Figure 17: Photos représentatives des inclusions positives pour l'ubiquiline 2 observées dans l'hippocampe d'un patient atteint de SLA liée à l'ubiquiline 2 ^{P506T}	51
Figure 18: Représentation schématisée du contrôle de l'expression du gène codant pour l'ubiquiline 2 mutée.	54
Figure 19: Les agents neuroprotecteurs et leur cible dans la pathogénèse de la SLA.....	65
Figure 20: L'organisation du génome de l'AAV	68
Figure 21: Étapes majeures du trafic intracellulaire des particules d'AAV	70
Figure 22: Le cycle répliatif de l'AAV.	71
Figure 23: Test d'agrippement.	91
Figure 24: Principe de mesure de la longueur et du chevauchement des pas	91
Figure 25: Cage utilisée pour le test d'anxiété clair/obscur.....	92
Figure 26: Expression et localisation de l'ubiquiline 2 dans les cellules NSC-34 et Neuro2a	96
Figure 27: Expression de l'ubiquiline 2 humaine 48h après la transfection des cellules NSC-34	97
Figure 28: Représentation schématisée des plasmides AAV-GFP, AAV-Ub2 et AAV-Ub2Mut.	98
Figure 29: Expression de l'ubiquiline 2 humaine suite à la transfection des cellules NSC-34	98
Figure 30: Représentation schématisée de l'injection en ICV des AAV10	99
Figure 31: Expression de la GFP dans le cerveau, la moelle épinière et le muscle squelettique.....	101
Figure 32: Représentation schématisée du protocole mis en place pour la caractérisation du modèle animal.....	102
Figure 33: Expression de l'ubiquiline 2 humaine dans la moelle épinière et le cerveau	103
Figure 34: Réduction de la survie et du poids chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine mutée.	105

Figure 35: Présence d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 dans le cortex moteur et l'hippocampe	107
Figure 36: Présence d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 dans le cervelet.....	108
Figure 37: Présence d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 dans moelle épinière	109
Figure 38: Présence d'agrégats positifs pour p62 dans le cerveau.....	110
Figure 39: Présence d'agrégats positifs pour p62 et l'ubiquitine dans la moelle épinière.....	111
Figure 40: Présence d'agrégats positifs pour l'ubiquitine dans le cerveau	113
Figure 41: Réduction du volume cérébral des souris exprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.	115
Figure 42: Astrogliose observée dans le cerveau des souris surexprimant	116
Figure 43: Perte des MNs dans la moelle épinière des souris exprimant.....	117
Figure 44: Astrogliose observée dans la moelle épinière des souris surexprimant.....	118
Figure 45: Observation d'une atrophie musculaire chez les souris surexprimant.....	119
Figure 46: Augmentation du nombre de fibres musculaires oxydatives dans le <i>Tibialis anterior</i> des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.	120
Figure 47: Observation d'une faiblesse musculaire chez les souris surexprimant	121
Figure 48: Observation de troubles moteurs chez les souris surexprimant	122
Figure 49: Observation de signes d'anxiété chez les souris surexprimant	124
Figure 50: Observation d'un phénotype « clasping » chez les souris surexprimant.....	125
Figure 51: Observation d'un phénotype « spinning » chez les souris surexprimant	125
Figure 52: Vérification de l'efficacité d'immunoprécipitation par western blot.	126
Figure 53: Migration sur gel des protéines co-immunoprécipitées avec l'ubiquiline 2 de moelle épinière.....	127
Figure 54: Liste de protéines identifiées suite à l'analyse par spectrométrie de masse.	128
Figure 55: Schéma du protéasome montrant les protéines interagissant uniquement.....	129
Figure 56: Western blot montrant l'accumulation anormale d'ubiquitine dans le cerveau	130
Figure 57: Perte d'interaction de l'ubiquiline 2 avec l' α -spectrine chez les souris.....	131
Figure 58: Accumulation des formes complète et clivées de l' α -spectrine dans les cellules NSC-34. 132	
Figure 59: Accumulation des formes complète et clivée de l' α -spectrine dans le cortex	133
Figure 60: Révélation au rouge Ponceau des protéines du cortex d'individus contrôles ou atteints de SLAs	133
Figure 61: Analyse du nombre d'agrégats d'ubiquiline 2 suite au traitement au BM.	135

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Critères d'Airlie House pour le diagnostic de la SLA	15
Tableau 2: Principaux gènes associés à la SLA	17
Tableau 3: Modèles de SLA liée à l' <i>UBQLN2</i> avec leurs caractéristiques physiopathologiques.....	59
Tableau 4: Séquence des amorces.....	83
Tableau 5: Titre des vecteurs AAVr.....	85
Tableau 6: Caractéristiques des individus contrôles (témoin) et des patients atteints de SLA sporadiques.	93

ABREVIATIONS

µm : micromètre
32G : 32 Gauges
A315T : Alanine substituée en Thréonine en position 315
A382T : Alanine substituée en Thréonine en position 382
A4V : Alanine substituée en Valine en position 4
AAV : Adéno-Associated Virus
AAVdb : Adéno-Associated Virus double brin
AAVr : Adéno-Associated Virus recombinant
AAVsb : Adéno-Associated Virus simple brin
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
alfa-1 (ok3062) : α1-antitrypsine
ALS : Amyotrophic Lateral Sclerosis
AMC : Autophagie Médiée par les Chaperonnes
AMPA : α-alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate
ANG : Angiogénine
APP : Aphasie Primaire Progressive
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARN-sh : ARN en épingle à cheveux (short hairpin)
ARNsi : ARN interférent (small interfering)
ATP : Adénosine TriPhosphate
ATPase : Adénosine TriPhosphatase
ATXN2 : Ataxine 2
b : bases
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
BM : Bleu de Méthylène
BSA : Bovine Serum Albumin
C21ORF2 : Chromosome 21 Open Reading Frame 2
C9ORF72 : Chromosome 9 Open Reading Frame 72
CaMkα2 : Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II alpha
CAP : Calcium-dependent Activator Protein
CBA : Chromosome Bactérien Artificiel
CD19+ : Cluster of Differentiation 19
CD33+ : Cluster of Differentiation 33
CD4+ : Cluster of Differentiation 4
CD8+ : Cluster of Differentiation 8
ChAT : Choline Acetyltransferase
CHCHD10 : Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10
CHMP2B : Charged Multivesicular body Protein 2B
CMA : Chaperone Mediated Autophagy
CO2 : dioxyde de carbone
CTFs : phosphorylated C-Terminal Fragments
Ctip2 : Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2
CTL : contrôle
D83G : acide aspartique substitué en Glycine en position 83
D90A : acide aspartique substitué en Alanine en position 90
DAO : D-amino Acid Oxidase
DARE : Dégradation des protéines Associées au Réticulum Endoplasmique
db : double brin
DCTN1 : Dynactin subunit 1
DD : Duplex Dimer
DFT : Démence Fronto-Temporale
DFTvc : DFT à variante comportementale
DLFT : Dégénérescence Lobaire Fronto-Temporale

DM : Duplex Monomer
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRP : Dynamin-Related Protein
DS : Démence Sémantique
E478G : acide glutamique substitué en Glycine en position 478
E54D : acide glutamique substitué en acide aspartique en position 54
EAAT2 : Transporteur d'acide aminé excitatoire
ECL : Enhanced ChemiLuminescence
EEA1 : Early Endosome Antigen 1
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein
ENMG : ElectroNeuroMyoGramme
ERN : Expansion d'une Répétition de Nucléotides
ESS : cellules souches embryonnaires
FDA : Food and Drug Administration
FFPE : Formaldehyde Fixed-Paraffin Embedded
FTDALS: FrontoTemporal Dementia - Amyotrophic Lateral Sclerosis
FTLD: FrontoTemporal Lobar Dementia
FUS: Fused in Sarcoma
FVB : Friend Virus B
Fw : Forward
FXTAS : Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome
g : gramme
G127X : Glycine substituée en un autre acide aminé en position 127
G298S : Glycine substituée en Sérine en position 298
G348C : Glycine substituée en Cystéine en position 348
G37R : Glycine substituée en arginine en position 37
G4C2 : Guanine(4)-Cytosine(2)
G85R : Glycine substituée en arginine en position 85
G93A : Glycine substituée en Alanine en position 93
GDNF : Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP : Green Fluorescent Protein
GLT1: Glutamate Transporter 1
gv/ml : génomes viraux par millilitre
H46R : Histidine substituée en arginine en position 46
H48Q : Histidine substituée en glutamine en position 48
HCl : acide chlorhydrique
HEK293T : Human Embryonic Kidney cells
Herp : Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein
hnRNPA1 : heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein A1
hnRNPA2B1 : heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein A2/B1
HPR : Horseradish Peroxydase
HSC : Hematopoietic Stem Cells
HSC70 : Heat Shock Cognate protein 70
hSOD1 : SOD1 humaine
Hsp70 : Heat shock protein 70
I113T : Isoleucine substituée en Thréonine en position 113
Iba-1 : Ionized calcium binding adapter molecule 1
ICV : IntraCérébroVentriculaire
IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1
IgG : Immunoglobuline G
IL-6 : Interleukine 6
Ipsc : Induced pluripotent stem cells
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITR : Inverted Terminal Repeat
IV : IntraVeineux
JO : Jour 0
kDa : kilo Dalton
KO : Knock Out

L126Z : mutation stop à la Leucine en position 126
L84V : Leucine substituée en Valine en position 84
lacZ : beta-lactamase Z
LAMP-2A : Lysosomal Associated Membrane Protein type 2A
LC3 : Light Chain 3
LIR : LC3 Interacting Region
LTR : Long Terminal Repeat
M337V : Méthionine substituée en Valine en position 337
MAP 1-LC3 : Microtubule-Associated Protein 1-Light Chain 3
MATR3 : Matrine 3
miARN : micro-ARN artificiel
MN : MotoNeurone
MNC : MotoNeurones Centraux
MNP : MotoNeurones Périphériques
MOBP : Myelin-associated Oligodendrocyte Basic Protein
MOPS : 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
MSC : Mesenchymal Stem Cells
N : Newton
NaCl : chlorure de sodium
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NEK1 : NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1
NeuN : Neuronal specific Nuclear
Neuro2a : Neuroblastoma
NI : Non Injectées
NIAID : National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NK : Natural Killer
NMD : Nonsense-Mediated Decay
NMDA : N-Methyl-D-Aspartic acid
NOR-test: Novel Object Recognition test
NSC-34 : Neuroblastoma Spinal Cord cells
N-Src : Neural form of Src (Sarcoma)
NT : Non Transfecté
OPTN : Optineurine
P1 : Post Natal 1
P506T : Proline substituée en Thréonine en position 506
P520T : Proline substituée en Thréonine en position 520
p62 : nucleoporin 62
pb : paire de bases
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PcDNA : plasmide ADN complémentaire
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFA : ParaFormAldehyde
PFN1 : Profiline 1
PGK : PhosphoGlycérate Kinase
PGRN: Protein Granulin precursor
PPII : hélice de PolyProline de type II
PVDF : PolyVinylidene DiFluoride
PXX : P = proline, X = autre acide aminé
Q331K : Glutamine substituée en Lysine en position 331
Q398X : Glutamine substituée en un autre acide aminé en position 398
RE : Réticulum Endoplasmique
REP : Replication initiator Protein
Rev : Reverse
rhAAV10 : rhésus AAV10
RIPA : Radio Immuno Precipitation Assay
RT-PCR : Real Time Polymerase Chain Reaction
sb : simple brin
SCFD1 : Sec1 family domain-containing protein 1
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SEM : Standard Error of the Mean
Sh : Short hairpin
SH3 : Src Homology 3
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
SLAf : SLA familiale
SLAs : SLA sporadique
SMA : Spinal Muscular Atrophy
SNC : Système Nerveux Central
SOD1 : SuperOxyde Dismutase 1
SPTAN1 : Spectrin alpha chain
SQSTM1: Séquestrome 1
Sti1 : Stress induced protein 1
SUP : Système Ubiquitine-Protéasome
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TA : *Tibialis anterior*
TAF15 : TATA-box binding protein associated Factor 15
TARDBP : TAR DNA-binding protein 43
TDP-43 : TAR DNA-binding protein 43
tTA : tétracycline
TRE : Tetracycline-Response Element
TFIID : Transcription Factor II D
Tg : Trangénique
TRS : Terminal Resolution Site
TUBA4A : Tubuline Alpha 4a
Ub2Mut : Ubiquiline 2 Mutée
UBA : Ubiquitin-Associated domain
UBL : Ubiquitin-Like domain
Ubq : Ubiquitine
UBQLN 2: Ubiquiline 2
Ubx8 : Ubiquitin regulatory X domain-containing protein 8
UNC13A: Unc-13 homolog A
UPR : Unfolded Protein Response
UTR : UnTranslated Region
VAPB : Vesicle Associated membrane Protein B
VCP : Valosin Containing Protein
vg : viral genome
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
WPRE : Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional regulatory element

INTRODUCTION

1 La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

Les amyotrophies progressives et incurables se caractérisent par la dégénérescence des neurones moteurs, appelés motoneurons (MNs, assurant le contrôle de la motricité), au niveau du cortex moteur, du bulbe rachidien et/ou de la moelle épinière (Strong, 2003; Monani, 2005). La SLA est la maladie du MN la plus fréquente chez l'adulte, suivie de la maladie de Kennedy (X-linked Spinal and Bulbar Muscular Atrophy ou SBMA) et de la Sclérose Latérale Primitive (SLP) (MacLean et al. 1996; Singer et al. 2007). Les maladies du MN sont relativement rares et forment un groupe cliniquement hétérogène (origine familiale ou sporadique, pouvant toucher aussi bien l'enfant que l'adulte). Dans tous les cas, la dégénérescence des MNs conduit à une faiblesse et une atrophie musculaire, voire même à des difficultés de langage et de déglutition dans certains cas, ainsi qu'à une détresse respiratoire (Gordon et al., 2013).

1.1 Présentation générale de la maladie

1.1.1 Historique et description de la SLA

La Sclérose Latérale Amyotrophique a été décrite pour la première fois, en 1850, par le docteur François Amilcar Aran. A cette époque, elle est appelée « Atrophie Musculaire Progressive » en raison des caractéristiques phénotypiques observées : perte de poids, faiblesse musculaire, dyspnée (difficultés respiratoires), rigidité des membres ainsi que des fasciculations (contractions musculaires involontaires : tressautements) (François Amilcar Aran, 1850). En 1853, les médecins Guillaume Duchenne et Jean Cruveilhier décrivent d'un point de vue clinique la forme bulbaire de la maladie. Au cours d'une autopsie, Jean Cruveilhier démontre une atteinte de la moelle épinière avec l'atrophie des racines antérieures qui précède l'atrophie musculaire (Cruveilhier, 1853-4). Par la suite, Jean-Martin Charcot met en évidence l'atteinte du bulbe chez une jeune femme atteinte d'une faiblesse progressive, de contractures et d'anormalités sensorielles. En effet, il a pu observer des changements sclérotiques gris brunâtres dans les aires latérales de la moelle épinière cervicale mais pas dans les cornes antérieures. En revanche, il a remarqué des lésions dans les cornes antérieures accompagnées d'une dégénérescence des cellules nerveuses motrices chez un enfant paralysé. Il en déduit que la sclérose latérale est associée à la spasticité et aux contractures, alors que les pathologies des cornes ventrales sont liées à la faiblesse musculaire atrophique. Ainsi, la maladie s'appelle désormais la « Sclérose Latérale Amyotrophique » (SLA), ou encore la maladie de Charcot, qu'il décrit avec précision dans le recueil de ses « Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière » en 1874 (Bromberg, 2015).

La SLA est une maladie neurodégénérative rare incurable qui touche le système moteur. Le nom de la maladie fait référence aux différents compartiments tissulaires qui sont sévèrement touchés. Tout d'abord, la "sclérose" désigne le tissu cicatriciel et fibreux laissé par la dégénérescence des MNs. Ensuite, le terme "latérale" fait référence aux MNs altérés qui sont situés de chaque côté de la moelle épinière, et enfin "amyotrophique" signifie l'atrophie des fibres musculaires avec la perte de masse musculaire (Musarò et al., 2010). La SLA est principalement caractérisée par la perte progressive des MNs localisés au niveau du cortex cérébral et du bulbe (MNs centraux), ainsi que dans la corne antérieure de la moelle épinière (MNs périphériques) (figure 1). Le rôle de ces MNs est de transmettre les signaux électriques provenant du cerveau et de la moelle épinière vers les muscles qui contrôlent les mouvements volontaires (Pradat et al., 2006).

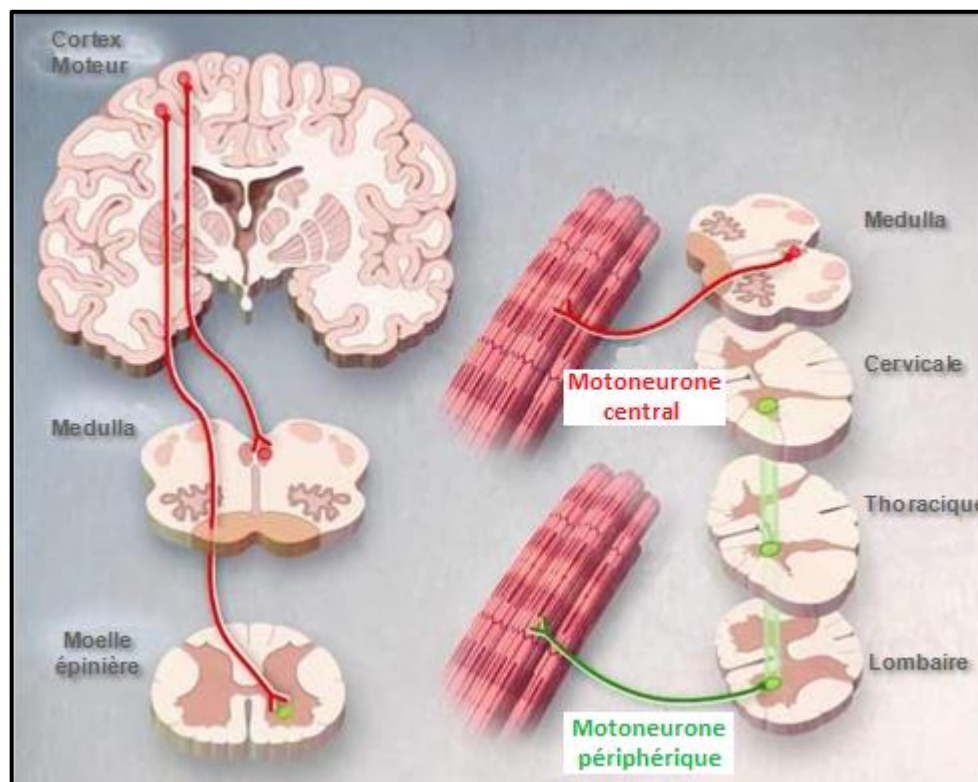


Figure 1 : Localisation des motoneurones centraux et périphériques dans le système nerveux central (SNC). La SLA touche les neurones moteurs centraux localisés dans le cortex cérébral et la médulla (en rouge), ainsi que les neurones moteurs périphériques situés dans les cornes antérieures de la moelle épinière (en vert). Schéma modifié à partir de : <http://yassermetwally.wordpress.com/dementia-alzheimer-type-and-others/motor-neuron-disease/>

1.1.2 Fréquence et répartition de la maladie

La SLA fait partie des maladies orphelines dont l'incidence annuelle est relativement homogène dans le monde (environ 1,9 cas sur 100 000 personnes) (Arthur et al., 2016), à l'exception de quelques populations ethniques moins affectées comme les Indiens d'Amérique, ou certaines régions plus touchées comme l'île de Guam, la péninsule japonaise Kii et la Nouvelle Guinée occidentale. Les taux d'incidence augmentent avec l'âge pour atteindre un pic entre 70 et 80 ans, avec davantage d'hommes touchés que de femmes (Gordon et al., 2013). La prévalence annuelle, d'environ 5 cas sur 100 000 personnes, reflète la rapidité à laquelle les patients décèdent après que la maladie soit diagnostiquée (Taylor et al., 2016).

1.1.3 Manifestations cliniques de la SLA

Les symptômes apparaissent généralement entre 50 et 60 ans (Gordon et al., 2013). En fonction de la région touchée, la SLA peut se présenter principalement sous deux formes :

- **la forme « spinale »** qui concerne les deux tiers des cas, est due à la dégénérescence des MNs situés dans la moelle épinière. Elle se manifeste dans les membres, avec le plus souvent des premiers symptômes dans un seul membre. Très vite, le patient aura une perte de sa dextérité, une faiblesse lorsqu'il lève les bras, des difficultés à marcher liées à une faiblesse des muscles releveurs du pied pouvant ainsi entraîner sa chute. L'apparition progressive des déficits moteurs s'accompagnent également de crampes et de fasciculations touchant les muscles atrophiés ou sains en apparence.

- **la forme « bulbaire »** est associée à la dégénérescence des MNs du tronc cérébral. Elle est plus fréquente chez les femmes âgées. La maladie débute le plus souvent par de la dysarthrie (troubles de l'élocution causée par des lésions des MNs dans le cerveau) suivie d'une dysphagie (difficulté à avaler) pouvant progresser en sialorrhée (sécrétion excessive de salive), de malnutrition et d'anarthrie (difficulté ou impossibilité d'articuler les sons du langage). La faiblesse axiale peut causer un chute de la tête et une cyphose (courbure dorsale excessive) qui sont associées à la douleur et à un mauvais équilibre (Gordon et al., 2013).

Les patients peuvent ressentir des douleurs plus ou moins fortes qui sont souvent associées aux contractions musculaires, aux crampes musculaires, à la mobilité articulaire réduite, à la pression cutanée causée par l'immobilité et pouvant entraîner la formation d'escarres (Hanisch et al., 2015).

Auparavant, la SLA était diagnostiquée comme une pathologie exclusivement neuromusculaire sans atteinte cognitive, mais elle est maintenant considérée comme une maladie avec un large spectre comprenant également des cas qui associent d'importants déficits

neuromusculaires et cognitifs (Montuschi et al., 2015, Ringholz et al., 2005). Jusqu'à 50% des cas de SLA présentent des **troubles cognitifs** et environ 15% montrent des signes de **Démence Frontotemporale (DFT)** qui se manifestent par des changements du comportement et de la personnalité, avec des difficultés au niveau des fonctions exécutives, du langage et du jugement (Montuschi et al., 2015, Ringholz et al., 2005). Ces cas de SLA-DFT ont une survie plus courte, peut-être en raison de l'indécision du patient à suivre les soins. A n'importe quel stade de la maladie, des signes de dépression et d'anxiété peuvent également apparaître (Gordon et al., 2013).

Les symptômes apparaissent de façon progressive et ils sont variables d'un patient à l'autre ou chez différents membres issus d'une même famille portant la même mutation du gène (Gordon et al., 2013). Les patients décèdent généralement 3 à 5 ans après l'apparition des symptômes par une insuffisance respiratoire (Rowland et al., 2001).

1.1.4 Diagnostic et pronostic

Diagnostic :

Le diagnostic positif de la maladie repose sur la mise en évidence de signes cliniques, mais il est parfois difficile à établir en raison de la discrétion des premiers symptômes (crampes, faiblesse de la main, modification de la voix). De plus, le médecin doit effectuer un diagnostic différentiel dans le but d'écarter les maladies qui présentent certains symptômes identiques à la SLA.

Pour cela, un **électroneuromyogramme (ENMG)** est systématiquement réalisé afin de vérifier si les muscles et les neurones moteurs périphériques sont atteints. Cet examen se fait en deux temps :

- le muscle est stimulé par un courant électrique de manière directe (électrodes en contact du muscle) ou indirecte (électrodes en contact des MNs). En cas de SLA, l'ENMG révèle que le muscle se contracte normalement mais que les MNs innervant le muscle ne transmettent plus ou mal l'influx nerveux, signifiant une dénervation. Les résultats de l'ENMG montrent alors généralement des vitesses de conduction motrice et sensitive normales, par contre, l'amplitude du potentiel d'action musculaire décroît suivant le degré de perte motoneuronale.

- l'activité électrique des muscles au repos et lors d'une contraction volontaire est enregistrée à l'aide d'une électrode-aiguille insérée dans le muscle. Au repos, l'atteinte des MNs se traduit par des signes de dénervation active (fibrillations et ondes lentes positives) associés à des fasciculations. Lors d'une contraction volontaire, l'ENMG révèle une réduction du nombre de potentiels d'unité motrice (Couratier et al., 2014).

L'ENMG peut être aussi réalisé par stimulation transcrânienne pour vérifier si les neurones moteurs centraux sont touchés (Couratier et al., 2014).

Des analyses d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) sont également réalisées pour compléter le diagnostic différentiel. L'IRM cérébrale permet notamment de vérifier l'hypothèse de tumeur localisée au niveau du tronc cérébral. L'IRM médullaire, quant à elle, permet de diagnostiquer une myélopathie cervicale, une ischémie médullaire et une syringomyélie (Couratier et al., 2014).

La suspicion d'un lymphome est écartée par des **analyses biologiques** (hémogramme, mesure de la vitesse de sédimentation ou dosage de la protéine C-réactive, électrophorèse des protéines sériques) (Couratier et al., 2014).

L'examen du liquide cérébro-spinal, prélevé par ponction lombaire, permet d'orienter le diagnostic différentiel vers une autre affection que la SLA, comme un lymphome ou une maladie infectieuse (maladie de Lyme, syphilis, VIH) (Couratier et al., 2014).

Le niveau de certitude du diagnostic de la SLA est défini suivant les critères d'El Escorial ou les critères d'Airlie House, ces derniers étant une révision des critères d'El Escorial (**tableau 1**) (Couratier et al., 2014).

Tableau 1: Critères d'Airlie House pour le diagnostic de la SLA (Couratier et al., 2014).

Niveau de certitude	Caractéristiques
SLA cliniquement certaine	Signes d'atteinte des MNC et MNP : région bulbaire et 2 régions spinales ou 3 régions spinales
SLA cliniquement probable	Signes d'atteinte des MNC et MNP dans au moins 2 régions avec des signes d'atteintes du MNC rostral par rapport aux signes périphériques
SLA cliniquement probable étayée par des examens paracliniques	Signes d'atteinte des MNC et MNP dans 1 région et signes d'atteinte du MNP par ENMG dans au moins 2 régions* ou Signes d'atteinte des MNC dans 1 région et signes d'atteinte du MNP par ENMG dans au moins 2 régions*
SLA cliniquement possible	Signes d'atteinte des MNP et MNC dans 1 région* ou Signes d'atteinte des MNC dans au moins 2 régions* ou Signes d'atteinte des MNP rostraux par rapport aux signes d'atteinte des MNC avec absence de preuve électrophysiologique d'atteinte des MNP dans d'autres régions*

MNC : motoneurones centraux ; MNP : motoneurones périphériques. * après exclusion des autres causes par neuro-imagerie, électrophysiologie et investigations biologiques.

Pronostic :

La médiane de survie est en moyenne de 19 mois à partir du diagnostic et de 30 mois à partir de l'apparition des symptômes, mais elle est très variable suivant les cas, allant de quelques mois à plusieurs dizaines d'années (Gordon et al., 2013). Généralement, un meilleur pronostic de survie est associé à une SLA avec un début spinal plutôt que bulbaire, un diagnostic réalisé à un âge précoce, une progression lente des symptômes, une atteinte respiratoire moins grave, une meilleure fonction motrice, un poids stable ainsi qu'une durée plus longue entre l'apparition des symptômes et le diagnostic (Gordon et al., 2013 ; Couratier et al., 2014). En fonction des mutations génétiques responsables des formes familiales de SLA, la durée de survie est variable. Par exemples, les mutations des gènes *C9ORF72* et *FUS* (présentés dans les paragraphes « 1.3.6 La SLA liée à *C9ORF72* » et « 1.3.3 La SLA liée à *FUS* ») sont associés à une durée de survie plus courte. Les différentes mutations identifiées dans le gène *SOD1* (présenté dans le paragraphe « 1.3.1 La SLA liée à *SOD1* ») ne vont pas avoir le même impact sur la durée de survie, comme c'est le cas pour la mutation A4V qui est une forme très rapide de la maladie comparée aux mutations D90A (Couratier et al., 2014).

1.2 Les différentes formes de SLA

1.2.1 Les formes sporadiques et familiales de la SLA

La majorité des formes de SLA sont des formes sporadiques (SLAs) et leurs causes sont encore inconnues ; environ 10% des cas de SLA sont des **formes familiales (SLAf)**. Pour ces deux formes, les mécanismes impliqués dans la dégénérescence des MNs sont encore mal connus du fait de leur complexité et des causes multifactorielles. La SLAf est liée à des facteurs génétiques qui sont, dans la majorité des cas, à caractère dominant avec une forte pénétrance. Jusqu'à présent, plus de 100 gènes lui sont associés (les gènes associés à la SLA les plus étudiés sont présentés dans le **tableau 2**, les autres mutations sont référencées dans la base de données « ALSod database ») et la cause génétique est connue dans plus de 70% des cas (Al-Chalabi et al., 2013). Certaines SLAs peuvent également présenter des variations génétiques touchant des gènes responsables de SLAf. Néanmoins, la cause de la maladie est inconnue pour la majorité des patients atteints de SLAs (Taylor et al., 2016). D'autres gènes mutés, encore non identifiés, ainsi que des facteurs de risques environnementaux (activité physique intense, le tabac, certains métaux lourds, etc.) pourraient expliquer ces cas (Al-Chalabi et al., 2013).

Tableau 2 : Principaux gènes associés à la SLA (d'après : [Alsultan et al., 2016](#) ; [Taylor et al., 2016](#); [Al Chalabi et al., 2013](#) ; [Boylan, 2015](#) ; [Edens et al., 2017](#)).

Classification	Locus	Gène	Protéine
ALS 1	21q22	<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1
ALS 2	2q33.2	<i>ALS2</i>	Alsin
ALS 3	18q21	Inconnu	Inconnu
ALS 4	9q34	<i>SETX</i>	Senataxin
ALS 5	15q14	<i>SPG11</i>	Spatacsin
ALS 6	16p11.2	<i>FUS</i>	Fused in sarcoma
ALS 7	20p13	Inconnu	Inconnu
ALS 8	20q13.3	<i>VAPB</i>	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B
ALS 9	14q11.2	<i>ANG</i>	Angiogenin
ALS 10	1p36.2	<i>TARDBP</i>	TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)
ALS 11	6q21	<i>FIG4</i>	Polyphosphoinositide phosphatase
ALS 12	10p13	<i>OPTN</i>	Optineurin
ALS 13	12q24.1	<i>ATXN2</i>	Ataxin-2
ALS 14	9p13.3	<i>VCP</i>	Valosin-containing protein
ALS 15	Xp11.21	<i>UBQLN2</i>	Ubiquilin 2
ALS 16	9p13.3	<i>SIGMAR1</i>	Sigma non-opioid intracellular receptor 1
ALS 17	3p11.2	<i>CHMP2B</i>	Chromatin modifying protein 2B
ALS 18	17p13.3	<i>PFN1</i>	Profilin 1
ALS 19	2q34	<i>ERBB4</i>	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4
ALS 20	12q13.13	<i>HNRNPA1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
ALS 21	5q31.2	<i>MATR3</i>	Matrin 3
ALS 22	2q36.1	<i>TUBA4A</i>	Tubulin alpha-4A
FTDALS1	9p21.2	<i>C9ORF72</i>	Chromosome 9 open reading frame 72
FTDALS2	22q11.23	<i>CHCHD10</i>	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10
FTDALS3	5q35.3	<i>SQSTM1</i>	Sequestosome 1 (p62)
FTDALS4	12q14.1	<i>TBK1</i>	Serine/threonine-protein kinase TBK1
ALS	12q24	<i>DAO</i>	D-amino-acid oxidase
ALS	2p13	<i>DCTN1</i>	Dynactin subunit 1
ALS	8p21.1	<i>ELP3</i>	Elongator complex protein 3
ALS	7p15.2	<i>HNRNPA2B1</i>	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
ALS	22q12.1-q13.1	<i>NEFH</i>	Neurofilament heavy polypeptide
ALS	12q12	<i>PRPH</i>	Peripherin
ALS	2p22.3	<i>SPAST</i>	Spastin
ALS	17q12	<i>TAF15</i>	TATA-binding protein-associated factor 2N
ALS	1q22	<i>UBQLN4</i>	Ubiquilin 4
ALS	19p13.12	<i>UNC13A</i>	Unc-13 homolog A

Abréviations: **ALS**, Amyotrophic Lateral Sclerosis; **FTDALS**, FrontoTemporal Dementia – ALS.

1.2.2 La SLA avec Démence Fronto-Temporale (DFT)

La Démence Fronto-Temporale (DFT) est une maladie neurodégénérative qui touche les neurones situés dans les régions frontale et temporale du cortex cérébral. Dans la population de moins de 65 ans, la DFT est la deuxième forme de démence la plus commune (10 à 20% de toutes les démences) après celle observée dans la maladie d'Alzheimer (Ratnavalli *et al.*, 2002). Environ 40% de DFT sont des formes familiales (Snowden *et al.*, 2002). La maladie se manifeste par des changements du comportement et de la personnalité avec des troubles cognitifs et du langage. La DFT regroupe trois syndromes qui se chevauchent souvent (mais généralement une caractéristique spécifique prédomine) :

- **La DFT à variante comportementale (DFTvc)**, la plus commune, se caractérise par des troubles cognitifs et comportementaux associés à des changements dans la conduite personnelle et sociale ;
- **La Démence Sémantique (DS)** se caractérise principalement par un discours fluide avec une mauvaise compréhension du sens des mots et/ou de l'identité d'un objet ;
- **L'Aphasie Primaire Progressive (APP)** se caractérise par un discours progressif spontané non fluide avec agrammatisme (structures syntaxiques simplifiées et peu diversifiées), des paraphasies (transformation d'un mot ou substitution d'un mot pour un autre) et des difficultés ou incapacités à nommer (Neary *et al.*, 1998).

Selon une estimation, 15% des patients diagnostiqués pour la DFT présentent des symptômes de SLA et, à l'inverse, 15% des patients diagnostiqués pour la SLA montrent des signes de DFT (Ringholz *et al.*, 2005). De plus, un certain nombre de mutations ont été identifiées dans des cas de SLA, de DFT et de SLA-DFT (**figure 2 : A**). Les mutations dans le gène *C9ORF72* sont les plus connues. D'autres mutations touchent des protéines jouant un rôle dans les voies de dégradation protéique, essentielles pour assurer le maintien de la protéostasie. Il s'agit des protéines : ubiquiline 2, p62, optineurine, VCP, CHMP2B et VAPB. Des mutations dans les gènes codant pour les protéines TDP-43 et FUS, qui sont des protéines de liaison à l'ADN et à l'ARN (impliquées notamment dans la régulation de la transcription et de l'épissage), ont aussi été décrits dans ces cas pathologiques (Lattante *et al.*, 2013). L'une des principales questions qui se pose alors, est de savoir comment une même mutation génétique peut conduire à la SLA dans certains cas, et dans d'autres cas à la DFT ou à la SLA-DFT. Certains suggèrent que les variantes génétiques et l'environnement, mais pas seulement, pourraient être des facteurs influençant la prédisposition à la SLA/DFT, mais des données directes manquent actuellement (Lattante *et al.*, 2015).

D'un point de vue neuropathologique, 50% des patients atteints de DFT montrent des inclusions de protéines, dont 45% des cas ont des inclusions positives pour TDP-43 (Mackenzie et Rademakers, 2007) (figure 2 : B). Des études pathologiques *post-mortem* sur le cerveau de patients atteints de SLA ont révélé que la plupart d'entre eux présentaient des inclusions positives pour l'ubiquitine (sauf les patients atteints de SLA liée aux mutations de *SOD1*) et également des inclusions positives pour TDP-43 (Mackenzie et al., 2007). Par conséquent, la présence d'inclusions positives pour TDP-43 et de mutations touchant les mêmes gènes (codant pour des protéines impliquées dans la dégradation protéique) dans la SLA et la DFT montrent que **la perturbation de l'homéostasie des protéines est une caractéristique clé de ces deux maladies.**

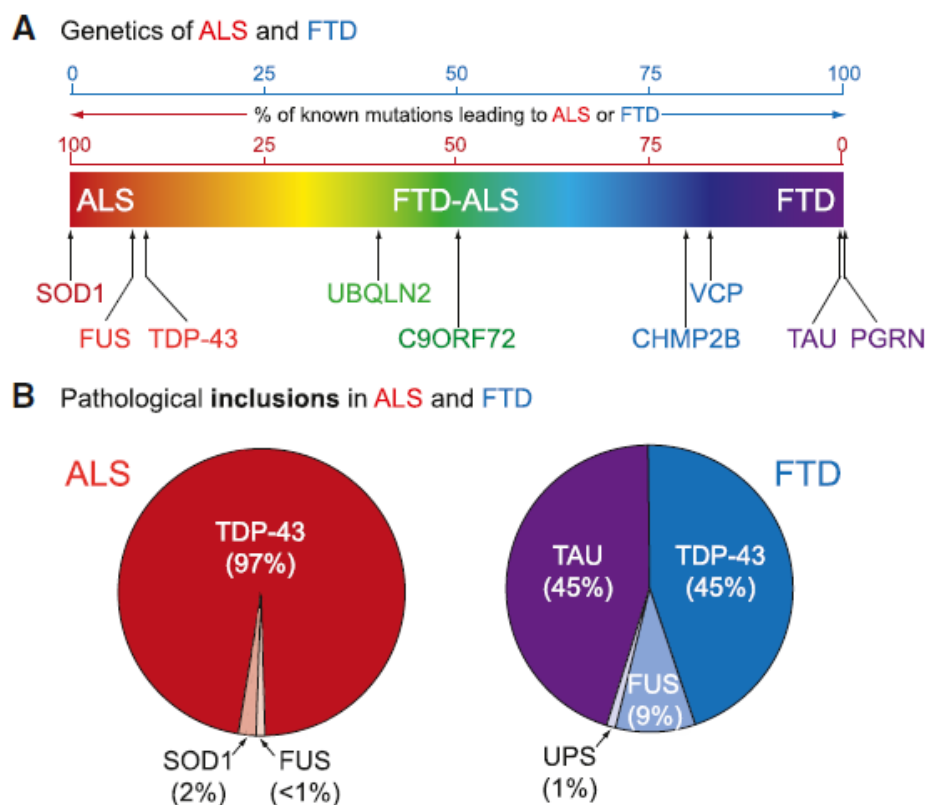


Figure 2 : Chevauchements clinique, génétique et pathologique de la SLA (ALS) et de la DFT (FTD).

(A) Représentation schématique des gènes connus, impliqués dans la SLA et la DFT. Les principales causes génétiques connues pour la SLA et la DFT sont représentées selon le pourcentage des mutations connues qui donnent lieu à la SLA et la DFT (rouge pour la SLA et bleu pour la DFT).

(B) Représentation des protéines retrouvées dans les inclusions pathologiques de la SLA et DFT (en %). Présence d'inclusions des protéines TDP-43 et FUS dans la SLA et la DFT, qui reflètent le chevauchement pathologique entre ces deux maladies (d'après Mackenzie et Rademakers, 2007).

La SLA et la DFT partagent donc certaines caractéristiques neuropathologiques, génétiques et cliniques, laissant supposer que des voies neurodégénératives communes sont impliquées dans ces deux pathologies. L'évidence croissante du chevauchement entre la SLA et la DFT sur les plans cliniques et pathologiques a fait l'objet de discussion lors d'un atelier de recherches (« The second international research workshop on FTD in ALS ») en 2007, qui a conduit à l'établissement de nouveaux critères pour le diagnostic des syndromes fronto-temporaux (signes cognitifs et comportementaux) observés chez les patients SLA (Strong et al., 2009). Ces critères sont organisés en 4 axes dont l'axe II consiste à définir les dysfonctionnements cognitifs et comportementaux associés à la SLA (Strong et al., 2009). Quatre catégories de patients atteints de SLA ont ainsi été définies :

- 1) La **SLA pure**, où seule une dégénérescence des MNs apparaît en absence de syndrome fronto-temporal ;
- 2) La **SLA avec des déficiences cognitives** ;
- 3) La **SLA avec des déficiences comportementales** ;
- 4) La **SLA avec des signes de DFT (SLA-DFT)** définis à partir des critères de Neary et al., 1998 présentés précédemment.

Aujourd'hui, ces deux pathologies représentent un vaste groupe de troubles neurodégénératifs dont plusieurs symptômes cliniques se recoupent (Ferrari et al., 2011 ; Ling et al., 2013).

1.3 Génétique de la SLA et mécanismes pathologiques

En raison du nombre important de gènes associés à la SLA, nous présentons dans ce rapport uniquement les SLA les plus étudiées (classées par ordre chronologique d'identification) (**figure 3**) et dont les gènes impliqués codent pour des protéines retrouvées dans les agrégats protéiques localisés dans les MNs (principale caractéristique de la pathologie d'un point de vue histologique). Ce choix fait le lien avec le projet de thèse qui consiste à générer et à caractériser un modèle de SLA liée aux mutations du gène *UBQLN2*, codant pour la protéine ubiquiline 2, impliquée dans la dégradation des protéines intracellulaires et détectée au sein des agrégats protéiques (Deng et al., 2011).

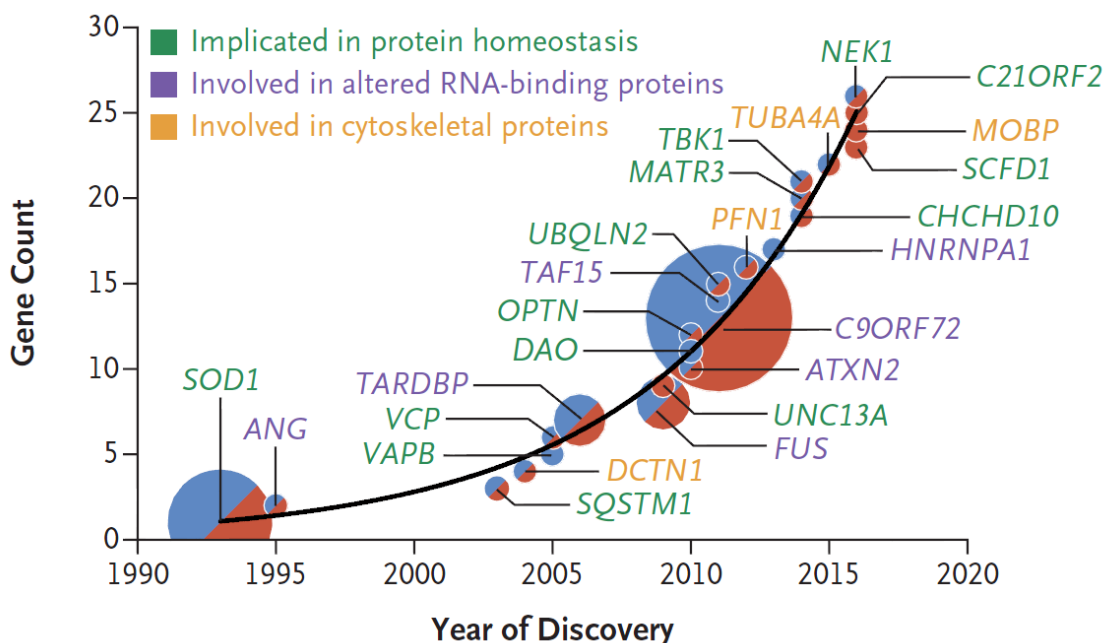


Figure 3: Graphique représentant les principaux gènes associés à la SLA, identifiés depuis 1993.

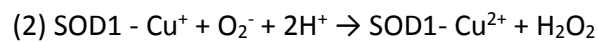
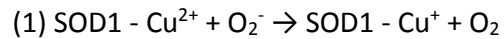
Le nombre cumulatif de gènes identifiés et responsables de SLA (indiqué en ordonnée) a augmenté rapidement durant ces 30 dernières années. La taille de chaque cercle reflète la proportion de tous les cas de SLA familiale associés à un gène (20% pour *SOD1* et 45% pour *C9ORF72*, par exemples). En bleu, sont représentés les gènes associés à des formes familiales de SLA et, en rouge, les gènes associés à la SLA sporadique (Brown et al., 2017).

1.3.1 La SLA liée à *SOD1* (ALS 1)

Les premières mutations responsables de SLAf ont été découvertes en 1993 dans le gène de la *SuperOxide Dismutase 1* (*SOD1*), localisé sur le chromosome 21. Il s'agit de 11 mutations faux-sens identifiées dans 13 familles touchées par la maladie (Rosen et al., 1993). Actuellement, plus de 150 mutations réparties dans les 5 exons du gène ont pu être identifiées, dont la plupart sont des mutations faux-sens. Leur transmission entre générations se fait de manière dominante. Parmi les différentes mutations faux-sens identifiées, la substitution A4V est associée aux symptômes cliniques les plus sévères et à une espérance de vie très courte d'environ un an. Il s'agit de la mutation la plus fréquente dans les cas de SLAf liée à la *SOD1* aux USA (Ray et al., 2004). La substitution D90A, en revanche, est associée à la progression la plus lente de la SLA liée à *SOD1* (Andersen et al., 1996).

La SLA liée à *SOD1* est la deuxième forme la plus courante et représente environ 20% des SLAf. Le gène *SOD1* code pour une métalloenzyme ubiquitaire de 153 acides aminés, la superoxyde dismutase 1 (*SOD1*), qui est principalement localisée dans le cytosol. Elle est constituée d'un homodimère dans lequel chaque monomère contient un ion de zinc jouant un rôle structural et un ion de cuivre intervenant comme cofacteur catalytique. Elle a un rôle déterminant dans la dégradation des radicaux libres toxiques produits par la respiration mitochondriale. En effet, cette

enzyme catalyse la dismutation des anions superoxydes (O_2^-) toxiques, qui ont été produits durant la phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries, en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) grâce à des cycles d'oxydoréduction de l'atome de cuivre lié à chaque sous-unité de SOD1 (Pasinelli et al., 2006) :



Le plus souvent, les mutations du gène *SOD1* altèrent son activité de dismutation. La corrélation entre l'activité enzymatique, la progression clinique et le phénotype de la maladie n'a pas encore été clairement démontrée (Pasinelli et al., 2006). **Les inclusions protéiques dans le cytoplasme des MNs dégénérescents sont caractéristiques de la maladie.** Ces inclusions contiennent des protéines mutées de SOD1. Dans les MNs, les mutations du gène *SOD1* conduisent à la synthèse de protéines ayant des propriétés toxiques. Le mécanisme pathogénique exact de la SOD1 mutée est encore inconnu, mais plusieurs hypothèses sur son rôle dans la SLA ont été proposées suite aux études menées sur des modèles murins transgéniques. Les souris invalidées pour le gène *SOD1* ne développent pas la maladie, bien qu'elles présentent une accélération de l'atrophie musculaire liée à l'âge avec une diminution de leur durée de vie (Reaume et al., 1996). Ainsi, les propriétés toxiques de la SOD1 mutée ne sont donc pas liées à une perte de la fonction de dismutation. Par ailleurs, différentes anomalies qui conduisent à la mort de la cellule ont été observées. En effet, ces processus de mort peuvent être induits par l'instabilité de la protéine mutante, par plusieurs défauts mitochondriaux à l'origine de la carence énergétique de la cellule, la sensibilité accrue au glutamate, l'activation de l'apoptose, ainsi que par l'inflammation des cellules non neuronales voisines (astrocytes). D'après ces observations, la fonction délétère de la SOD1 mutée pourrait s'expliquer soit par son rôle perturbateur sur le métabolisme de l'oxygène (**figure 4 : Aberrant redox chemistry**), soit par son instabilité conformationnelle (**figure 4 : Protein toxicity**) (Pasinelli et al., 2006).

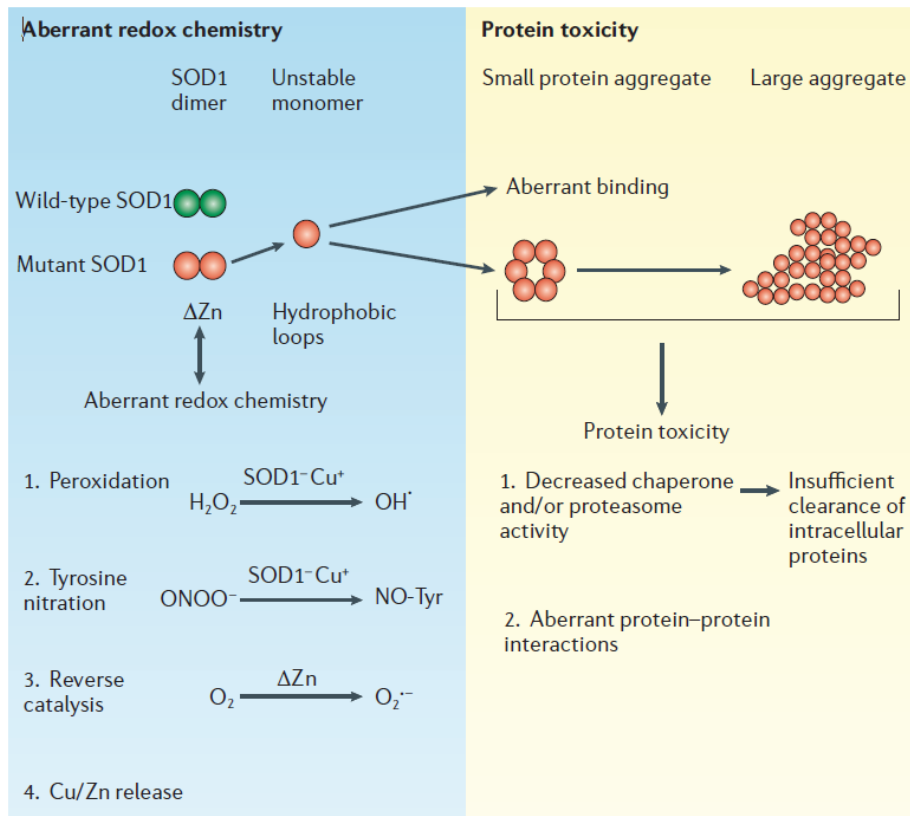


Figure 4 : Hypothèses sur le rôle toxique de la protéine SOD1 mutée.

Aberrant redox chemistry (oxydation) : l'instabilité de la SOD1 mutée engendrerait des interactions avec des substrats non conventionnels conduisant à des réactions d'oxydoréduction aberrantes. **(1 et 2)** Le peroxide d'hydrogène (H_2O_2) ou l'ion nitronium ($ONOO\cdot$) peut réagir avec la réduction de la SOD1 mutée ($SOD1-Cu^+$). **(3)** Le dioxygène (O_2) peut réagir avec le zinc de la SOD1 mutée (ΔZn) pour générer un excès d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). **(4)** La protéine mutée peut également libérer son atome de cuivre ou de zinc, ce qui pourrait être toxique. **Protein toxicity (agrégation) :** les mutations favoriseraient la dissociation des dimères de la protéine SOD1 entraînant ainsi, la formation de monomères instables pouvant alors former des agrégats protéiques toxiques en empêchant l'activité chaperonne et/ou du protéasome **(1)**. L'élimination des protéines ne serait alors plus efficace. Les agrégats pourraient aussi séquestrer, inactiver ou augmenter la toxicité en interagissant avec d'autres protéines cruciales **(2)** (d'après [Pasinelli et al., 2006](#)).

Modèles de rongeurs pour la SLA liée à SOD1

Le premier modèle animal transgénique pour la SLA a été développé en 1994, suite à la découverte des mutations au niveau du gène *SOD1* dans certaines formes de SLAf ([Turner et al., 2008](#)). Il s'agit de souris transgéniques $SOD1^{G93A}$, obtenues par l'introduction de plusieurs copies du gène humain *SOD1* muté en position 93 (substitution d'une glycine par une alanine) sous contrôle du promoteur humain du gène *SOD1*. Ces souris développent une pathologie dont les caractéristiques sont comparables à celles de la SLA humaine. Avant l'apparition des symptômes, diverses anomalies sont observées comme une dégénérescence des jonctions neuromusculaires entre 40 et 50 jours ([Frey et al., 2000](#) ; [Kennel et al., 1996](#)), une gliose qui s'intensifie avec le temps, une activation de la microglie à partir de 80 jours ([Fischer et al., 2004](#)) ainsi qu'une perte des MNs. Ces caractéristiques pathologiques conduisent à des troubles moteurs à partir de 80 à 90 jours,

avec un déclin de la force musculaire et un tremblement des pattes postérieures (Frey et al., 2000 ; Kennel et al., 1996). Une paralysie des pattes postérieures commence à apparaître vers 90 jours, qui progresse rapidement en une paralysie sévère jusqu'au décès vers 130 jours (Vinsant et al., 2013). Au niveau moléculaire, de nombreux agrégats intracellulaires ont été mis en évidence dans les MNs et les astrocytes, comparables à ceux observés chez les patients (Watanabe et al., 2001).

Aujourd'hui, une dizaine de modèles de souris transgéniques ont été créés et expriment l'une des 12 mutations du gène *SOD1* humain suivantes: A4V, G37R, H46R, H48Q, L84V, D83G, G85R, D90A, G93A, I113T, L126Z et G127X (Picher-Martel et al., 2016). Le phénotype pathologique, l'âge auquel débute la maladie, ainsi que la survie sont variables d'un modèle à l'autre. Cette hétérogénéité phénotypique serait dépendante du type de mutation, du niveau d'expression de la *SOD1* mutée, du genre et du fond génétique (Pfohl et al., 2015). Comme chez l'Homme, la maladie apparaît plus tardivement et la survie est prolongée chez les femelles par rapport aux mâles (McCombe et al., 2010). La plupart de ces modèles reproduisent plusieurs caractéristiques pathologiques de la SLA humaine : une paralysie fatale avec une dégénérescence des MNs, une gliose et la formation d'inclusions ubiquitinylées positives pour *SOD1* dans le cytoplasme des MNs et des astrocytes de la moelle épinière (Picher-Martel et al., 2016). Quelques modèles présentent des déficits cognitifs, notamment chez les souris *SOD1*^{G37R} qui développent des difficultés d'apprentissage à partir de 8 mois (Filali et al., 2011) et les souris *SOD1*^{G93A} qui ont un retard des capacités d'apprentissage et des troubles de la mémoire à long terme (Quarta et al., 2015).

A l'origine de cette forme familiale, l'hypothèse d'une perte de la fonction de dismutation de la protéine mutée *SOD1* a d'abord été envisagée. Mais des études ont montré par la suite que la délétion du gène *SOD1* chez les souris (souris knock-out *SOD1*^{-/-}) n'induisait pas de neurodégénérescence ni de trouble moteur jusqu'à l'âge de 6 mois (Reaume et al., 1996). Néanmoins, une axonopathie motrice distale a été observée chez ces souris (Shefner et al., 1999). Les mutations dans le gène *SOD1* s'accompagnent donc d'un gain de fonction toxique dont la nature exacte reste encore à déterminer (Reaume et al., 1996). Par ailleurs, le rôle de la forme sauvage de *SOD1* dans la pathologie doit être également clarifié. En effet, plusieurs études ont démontré que la *SOD1* sauvage n'était pas impliquée dans la neurodégénérescence de la SLA, mais que la surexpression de la *SOD1* humaine sauvage chez les souris *SOD1*^{G93A} induit une accélération de la perte des MNs, une paralysie et une mort plus précoces que les souris surexprimant uniquement la *SOD1*^{G93A} (Jaarsma et al., 2000). Un phénotype similaire à la SLA a également été décrit lorsque la *SOD1* sauvage est exprimée au même niveau que la *SOD1*^{G93A} chez un modèle murin (Graffmo et al., 2013).

Les modèles SLA-*SOD1* ont permis de faire d'importants progrès dans la connaissance de nombreux mécanismes physiopathologiques comme le stress oxydatif, les anomalies mitochondriales, les perturbations du transport axonal ou encore les phénomènes d'agrégation protéique. Néanmoins, ils modélisent les formes de SLA liées au gène *SOD1* muté et non les autres formes familiales non liées à la *SOD1* mutée ni les formes sporadiques de la SLA, en raison notamment de l'absence de la protéine TDP-43 dans les inclusions cytoplasmiques (ou seulement au stade terminal de la maladie) qui est pourtant un marqueur neuropathologique fondamental de la SLA humaine (y compris la SLA-*SOD1*) (Robertson et al., 2007; Shan et al., 2009). Malgré cela, ces modèles présentent de nombreux mécanismes biologiques impliqués dans la pathologie, communs aux différentes formes familiales et sporadiques de la SLA, ce qui en fait des modèles de référence encore aujourd'hui.

1.3.2 La SLA liée à *TARDBP* (ALS 10)

La découverte d'inclusions de la protéine nucléaire TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) dans le cytoplasme des MNs et des cellules gliales de patients atteints de formes familiales ou sporadiques de SLA (hors SLA avec des mutations dans les gènes *SOD1* et *FUS*) ou de DFT, suggère une implication de cette protéine dans la physiopathologie de ces maladies (Arai et al., 2006 ; Neumann et al., 2006). Cette observation a conduit plusieurs équipes scientifiques à rechercher la présence de mutations au niveau du gène *TARDBP* codant pour la protéine ubiquitaire TDP-43. Cette protéine multifonctionnelle est notamment impliquée dans la régulation de la transcription, l'épissage, le transport de l'ARN, la biosynthèse des mircoARN ainsi que dans l'apoptose (**figure 5**) (Buratti et Baralle, 2008 ; Ratti et Buratti, 2016). Les maladies neurodégénératives liées au dépôt de TDP-43 sont appelées «protéinopathies TDP-43». De surcroît, la propagation de la protéinopathie TDP-43 des MNs rachidiens et corticaux et des cellules gliales vers d'autres régions corticales peut être comparée à la progression de la SLA (Brettschneider et al., 2013).

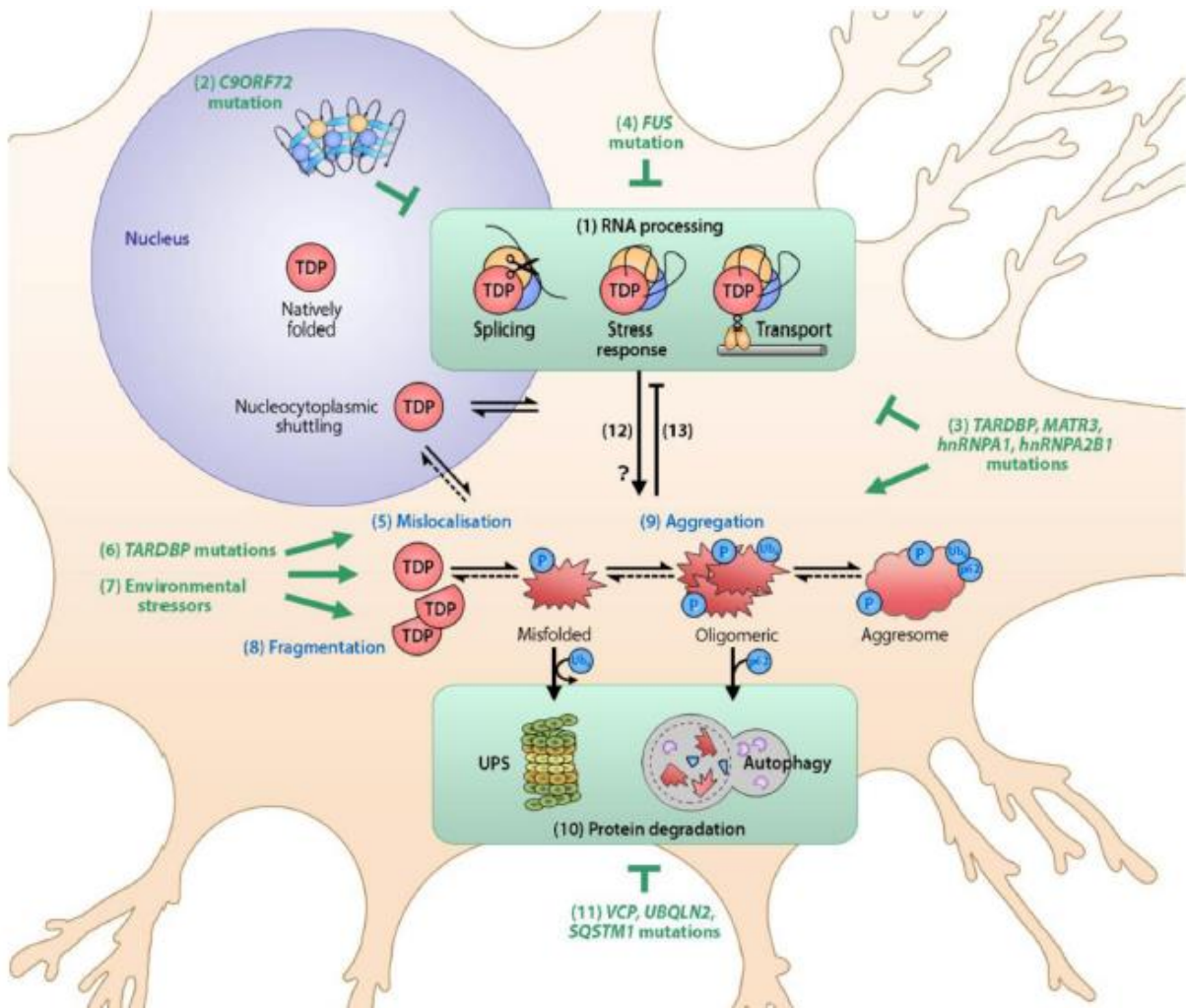


Figure 5 : Représentation schématique des gènes et des mécanismes conduisant à la protéinopathie TDP-43 et l'implication de celle-ci dans la pathogénèse de la SLA.

(1) TDP-43 est une protéine de liaison à l'ADN et l'ARN, impliquée dans le traitement des ARN. Sa forme repliée est localisée dans le noyau et intervient dans la régulation des épissages des ARN. Cette protéine agit également dans le cytoplasme où elle est impliquée dans le traitement des ARN comme la réponse aux stress ou le transport. (2) Les mutations de *C9ORF72* entraînent une séquestration des protéines de liaisons à l'ARN. La SLA liée à *C9ORF72* montre ainsi une accumulation et une agrégation de la protéine TDP-43. (3) Les mutations de *MATR3*, *hnRNPA1* et *hnRNPA2B1* induisent une protéinopathie TDP-43. Ces protéines interagissent directement avec TDP-43 en influençant sur son repliement et sa fonction. (4) Les mutations de *FUS* causent la SLA, indépendamment de la protéinopathie TDP-43, via les défauts de traitement des transcrits qui peuvent être des cibles communes à TDP-43. (5) La délocalisation en excès des protéines TDP-43 dans le cytoplasme peut être causée par (6) les mutations de *TARDBP* et (7) le stress environnemental, les deux conduisant également à la (8) fragmentation de TDP-43. (9) La délocalisation et le clivage de TDP-43 favorisent leur mauvais repliement et leur agrégation qui est associé à sa phosphorylation et ubiquitinylation anormales. (10) Le Système Ubiquitine Protéasome (SUP) et l'autophagie permettent de maintenir l'homéostasie de TDP-43. Cependant, dans la SLA, ces systèmes de dégradation des protéines ne parviennent pas à prévenir l'accumulation de TDP-43, favorisant ainsi la formation d'agrégats complexes. (11) Les mutations de *VCP*, *UBQLN2*, et *SQSTM1* peuvent nuire à la dégradation des protéines. (12) Le traitement d'ARN aberrants, et en particulier la formation de granules de stress, peut favoriser l'agrégation de TDP-43. (13) A l'inverse, le mauvais repliement de TDP-43 et son agrégation peuvent nuire au bon traitement des ARN (d'après [Scotter et al., 2015](#)).

En 2008, deux études réalisées sur 354 patients atteints de SLA sporadique ou familiale (non liée à *SOD1*) ont identifié des mutations dans le gène *TARDBP* chez 5% d'entre eux (Kabashi et al., 2008 ; Sreedharan et al., 2008). Plus d'une dizaine de mutations différentes ont été rapportées au cours de ces études. Aujourd'hui, ce sont plus de 40 mutations (faux-sens pour la plupart) qui ont été répertoriées dont les plus fréquentes sont G298S, A315T, M337V, G348C et A382T (Corcia et al., 2012). Les effets de ces mutations ne sont pas encore complètement élucidés. Plusieurs études ont toutefois démontré que la perte de fonction conditionnelle et partielle de TDP-43 peut induire des défauts des MNs, un phénotype moteur progressif et la formation d'inclusions TDP-43 (Wu et al., 2012 ; Iguchi et al., 2013 ; Kabashi et al., 2010). De même que la surexpression de la forme sauvage de TDP-43 conduit à la formation d'inclusions cytoplasmiques de TDP-43 (protéinopathie TDP-43) et au phénotype de la maladie, suggérant un gain de fonction toxique de TDP-43 (Wils et al., 2010 ; Li et al., 2010 ; Ash et al., 2010). Aujourd'hui, l'hypothèse à la fois d'un gain et d'une perte de fonction de TDP-43 pourrait définir les mécanismes pathologiques responsables de la maladie.

Les mutations dans le gène *TARDBP* ainsi que dans d'autres gènes liés à la SLA, comme *C9ORF72*, *FUS*, *SQSTM1* et *UBQLN2* sont impliqués dans la formation d'agrégats protéiques positifs pour TDP-43 dans le cytoplasme des cellules du SNC (figure 5) (Scotter et al., 2015). En condition normale, TDP-43 est une protéine majoritairement nucléaire mais dans le cas d'une protéinopathie TDP-43, celle-ci est délocalisée dans le cytoplasme et se présente sous forme agrégée anormalement hyperphosphorylée, ubiquitinylée et tronquée (figure 5) (Scotter et al., 2015).

Les inclusions cytoplasmiques positives pour TDP-43, observées dans le cerveau et la moelle épinière de patients atteints de SLA et de DFT (Neumann et al., 2006 ; Igaz et al., 2008), sont majoritairement composées de fragments phosphorylés correspondant à la partie C-terminale de TDP-43 (CTFs : phosphorylated C-Terminal Fragments). Plusieurs études ont montré que des mutations localisées dans la région C-terminale du gène *TARDBP* (Sreedharan et al., 2008 ; Rutherford et al., 2008), un stress cellulaire (Zhang et al., 2007 ; Dormann et al., 2009) ou une inhibition protéasomique (Huang et al., 2014) favoriseraient le clivage inapproprié de TDP-43, générant ainsi, un fragment C-terminal de 25kDa capable d'induire la mort cellulaire par gain de fonction toxique (Zhang et al., 2009). Dans des cas de SLAs, il a été démontré que lorsque le nombre de MNs est important, la protéine TDP-43 est, le plus souvent, répartie de manière diffuse dans le cytoplasme des MNs. En revanche, lorsqu'il y a une perte de MNs, la proportion de cellules dans lesquelles TDP-43 est diffus dans le cytoplasme diminue alors que le nombre de celles avec

des inclusions positives pour TDP-43 ne change pas. La redistribution cytoplasmique de TDP-43 pourrait alors précéder la formation d'agrégats insolubles (Giordana et al., 2010).

Dans une étude réalisée en 2008, les inclusions cytoplasmiques ubiquitinylées de cellules gliales de patients atteints de SLA ont été marquées par des anticorps reconnaissant des sérines phosphorylées localisées à différentes positions (p379, p403/404, p409, p410, p409/410) (Hasegawa et al., 2008). Du plus, des analyses biochimiques réalisées sur des fractions protéiques insolubles ont montré que les anticorps dirigés contre les sérines phosphorylées ne reconnaissent pas la forme entière de TDP-43 (43kDa), mais marquaient ses formes anormalement clivées de 25 et 45kDa. La phosphorylation en position 409/410 semble la plus fréquente au sein des inclusions (Hasegawa et al., 2008 ; Inukai et al., 2008). La protéine TDP-43 phosphorylée (p409/410) a été détectée dans toutes les inclusions ubiquitinylées mais également dans des granules (pré-inclusions) non ubiquitinylés, ce qui suggère que la phosphorylation de TDP-43 précède l'ubiquitinylation (Neumann et al., 2009).

Modèles de rongeurs pour la SLA liée à TARDBP

Suite à la découverte de la protéine TDP-43 comme composant majeur des inclusions retrouvées dans la plupart des formes sporadiques et familiales de SLA, plusieurs groupes de recherche ont tenté de générer un modèle animal développant cette pathologie. Afin de reproduire l'expression neuronale élevée de TDP-43 observée chez les patients (entre 1,5 et 2,5 fois supérieure à la normale), la forme humaine sauvage de TDP-43 a été surexprimée à des niveaux similaires chez la souris. Les différents modèles présentent des phénotypes variables suivant le niveau d'expression de TDP-43, mais aucun d'eux ne développe le phénotype complet de la SLA humaine avec l'absence d'inclusion cytoplasmique positive pour la forme phosphorylée de TDP-43 (ou une présence rare) et de dégénérescence liée à l'âge (Picher-Martel et al., 2016).

L'identification des différentes mutations dans le gène *TARDBP*, causant la SLA, a mené à la génération de modèles murins exprimant la protéine mutée en quantité variable suivant le promoteur utilisé. Parmi eux, les modèles SLA-*TARDBP*^{A315T} et SLA-*TARDBP*^{G348C}, qui expriment la protéine humaine mutée à des niveaux trois fois supérieurs à la normale, développent progressivement des déficits moteurs à partir de 9-10 mois et des troubles cognitifs comparables aux cas de DFT. A 10 mois, des inclusions cytosoliques et nucléaires composées de TDP-43 et d'ubiquitine ont été mises en évidence. Aucune paralysie n'a cependant été relevée chez ces animaux qui ont une durée de vie normale (Swarup et al., 2011). Les différents modèles de SLA liée aux mutations de *TARDBP* montrent seulement une corrélation entre les phénotypes observés

et les niveaux d'expression de TDP-43 mutée (pas de corrélation avec le type de mutation). Une faible expression de TDP-43 conduit à des troubles moteurs liés à l'âge et à la formation d'inclusions cytoplasmiques de TDP-43 dans les neurones mais sans paralysie, alors qu'une forte expression de cette protéine provoque des symptômes précoces et une progression de la maladie rapide sans véritable perte de MNs ni formation d'inclusions (Picher-Martel *et al.*, 2016).

Enfin, un double modèle transgénique surexprimant à la fois la forme sauvage et la forme mutée (Q331K) de TDP-43 a reproduit le plus grand nombre de caractéristiques de la pathologie humaine (à l'exception de dégénérescence liée à l'âge), à savoir des inclusions cytoplasmiques dans les neurones qui sont positives pour les protéines TDP-43, p62 et ubiquitine, une paralysie précoce des membres avec une progression rapide conduisant à la mort vers l'âge de 2 mois (Mitchell *et al.*, 2015).

D'autre part, des modèles de SLA-TDP-43 ont été créés chez le rat, la Drosophile, les nématodes et le poisson zèbre mais, là encore, les caractéristiques de la SLA n'ont pas toutes été retrouvées (Picher-Martel *et al.*, 2016).

1.3.3 La SLA liée à FUS (ALS 6)

L'identification des mutations de TDP-43 dans la SLA a rapidement été suivie par la découverte de mutations dans une autre protéine de liaison à l'ADN et à l'ARN ; la protéine FUS (FUsed in Sarcoma) (Kwiatkowski *et al.*, 2009 ; Vance *et al.*, 2009 ; Corrado *et al.*, 2010). Le gène *FUS*, localisé sur le chromosome 16 et composé de 15 exons, code pour une protéine de 526 acides aminés qui est principalement nucléaire. Cette protéine contribue à la restauration de l'ADN ainsi qu'à la régulation des processus de synthèse, de modification et de transport de l'ARN (figure 6) (Aman *et al.*, 1996).

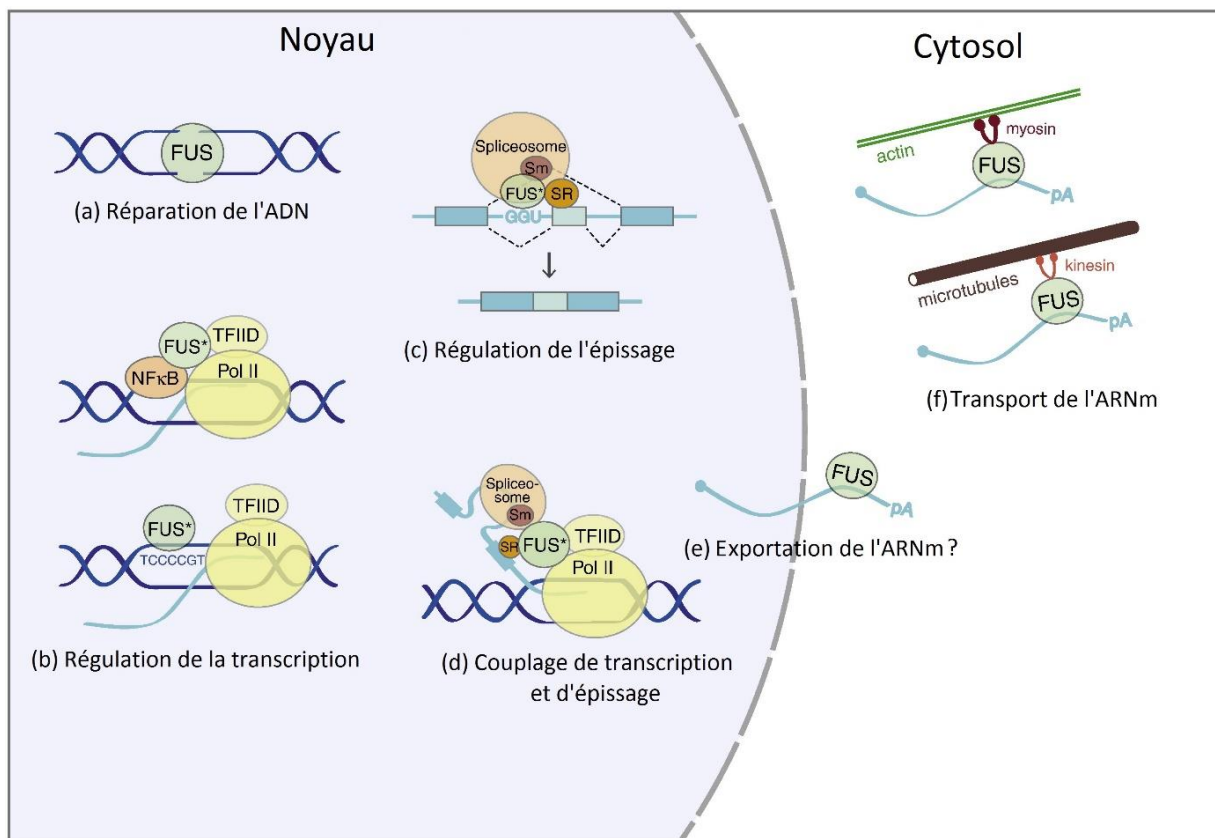


Figure 6 : Représentation schématique des fonctions physiologiques de FUS.

FUS est impliquée dans de multiples étapes du métabolisme de l'ADN et de l'ARN. (a) Elle a une activité d'association homologue à l'ADN et est importante pour la réparation des ruptures du double brin. (b) Elle interagit avec le complexe de pré-initiation de la transcription (ARN pol II et le complexe TFIID par exemples) et avec des facteurs de transcription spécifiques de certains gènes (NF-κB par exemple). En outre, FUS se lie directement à des séquences d'ADN spécifiques (TCCCCGT par exemple) dans la région promotrice de certains gènes cibles. (c) FUS affecte l'épissage alternatif en interagissant avec les régions introniques à proximité des sites d'épissage et en recrutant ensuite le spliceosome ou d'autres facteurs d'épissage, tels que les protéines hnRNP ou SR, au pré-ARNm naissant. (d) FUS interagit avec la machinerie de transcription et d'épissage. (e) FUS peut jouer un rôle dans l'exportation d'ARNm vers le cytoplasme. (f) Dans les neurones, FUS est impliquée dans le transport d'ARNm spécifiques (d'après [Dormann et Haass, 2013](#)).

Plus de 50 mutations, pour la plupart faux-sens, ont été identifiées dans le gène *FUS* comme étant responsables d'environ 4% des formes familiales et d'environ 1% des formes sporadiques de la SLA. Seulement quelques descriptions cliniques de la pathologie liée à ces mutations ont été effectuées et la corrélation phénotypique reste difficile à établir. De nombreux rapports suggèrent que l'apparition de la maladie est plus précoce dans les cas de SLA liée à *FUS*. En effet, une étude allemande réalisée sur plusieurs familles révèle un âge d'apparition de la maladie allant de 21 à 76 ans avec de nombreux cas avant l'âge de 40 ans ([Waibel et al., 2013](#)). La plupart des patients développent un phénotype de SLA classique sans défaut cognitif ; cependant quelques études ont présenté des patients développant des DFT avec dégénérescence des MNs et d'autres patients avec démence sans que les MNs soient touchés. Ceci suggère, une fois de plus, que la SLA et la DFT présentent des homologies cliniques, pathologiques et génétiques ([Lattante et al., 2013](#)).

Comme TDP-43, FUS est principalement nucléaire avec une faible accumulation cytoplasmique dans la plupart des types cellulaires. Des analyses *post-mortem* de cerveaux et de moelles épinières de patients portant des mutations dans le gène *FUS* ont révélé la présence anormale d'inclusions positives pour FUS dans les neurones et les cellules gliales. Ces inclusions se sont révélées immunoréactives pour p62 et l'ubiquitine mais étonnamment négatives pour TDP-43, suggérant que le processus de neurodégénération dirigé par les mutations de FUS est indépendant de la délocalisation de TDP-43. Ces inclusions de FUS ont également été identifiées dans le SNC de patients atteints de DFT. Une nouvelle fois, comme pour TDP-43, l'ubiquitylation des inclusions de FUS n'est pas toujours décelée (Saber *et al.*, 2015).

Modèles de rongeurs pour la SLA liée à FUS

Des modèles transgéniques de souris Knock-Out pour *FUS* (KO-*FUS*) ont été créés pour étudier l'effet de la suppression de FUS. Les souris qui en résultent ne survivent que 24 heures ou développent des déficits importants, comme la stérilité ou une instabilité chromosomique. D'autres modèles de souris KO-*FUS* présentent des troubles neuropsychiatriques qui ne correspondent pas à la SLA (Hicks *et al.*, 2000). Une surexpression de la forme humaine et sauvage de FUS, sous le contrôle du promoteur du prion murin, mène à un phénotype agressif des souris homozygotes. Ces souris ont un niveau d'expression de la protéine environ deux fois plus important et développent une faiblesse motrice jusqu'à la paralysie à l'âge de 8 semaines. Elles présentent un taux élevé d'inclusions cytoplasmiques de FUS non ubiquitylées, une perte de MNs dans la corne antérieure de la partie lombaire de la moelle épinière, une atteinte des jonctions neuromusculaires et une gliose (Kino *et al.*, 2015).

D'autre part, des souris transgéniques surexprimant la forme sauvage ou mutée de FUS, sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, développent une gliose et une faiblesse musculaire. Ces souris meurent de façon prématurée à l'âge de 30 jours mais ne présentent pas d'inclusion protéique positive pour FUS ni de dégénérescence des MNs (Sephton *et al.*, 2014).

1.3.4 La SLA liée à l'*OPTN* (ALS 12)

Trois mutations ont été identifiées dans le gène *OPTN* (optineurine) chez des patients atteints de SLA familiale ou sporadique : une mutation non-sens Q398X et une mutation faux-sens E478G localisées dans le domaine de liaison aux ubiquitines, ainsi qu'une délétion homozygote de l'exon 5 (Maruyama *et al.*, 2010). La protéine optineurine (*OPTN*), codée par ce gène, assure de multiples fonctions dont celle de récepteur autophagique (Liu *et al.*, 2014). Sur les 8 patients étudiés, un seul présente des inclusions cytoplasmiques positives pour l'optineurine dans les MNs (SLA liée à la mutation E478G) (Maruyama *et al.*, 2010). D'autres études réalisées sur les patients

porteurs des mutations Q398X et E478G n'ont pas détecté la protéine optineurine dans les inclusions cytoplasmiques positives pour TDP-43, p62 et l'ubiquitine dans les neurones (Ito et al., 2011 ; Kamada et al., 2014). En revanche, l'optineurine a été observée dans les inclusions cytoplasmiques au niveau de la moelle épinière dans des cas de SLAs (hors mutations dans le gène *OPTN*) et de SLA liée à *SOD1*. En effet, l'optineurine co-localise avec l'ubiquitine et TDP-43 dans les inclusions « skein-like » et avec l'ubiquitine dans les inclusions hyalines rondes chez des patients atteints de SLAs (Maruyama et al., 2010 ; Osawa et al., 2011). Elle co-localise également dans les inclusions hyalines de *SOD1* (de type corps de Lewy) dans des cas de SLA liée à *SOD1* (Maruyama et al., 2010). Néanmoins, les inclusions d'optineurine semblent relativement rares et limitées à une minorité de SLA avec une protéinopathie TDP-43 ainsi que dans les cas de DLFT-TDP suggérant qu'elle ne jouerait pas un rôle central dans la pathogénèse de la SLA et de la DLFT (Hortobágyi et al., 2011).

Modèles animaux pour la SLA liée à l'*OPTN*

Les quelques modèles animaux générés jusqu'à présent ne reproduisent pas toutes les caractéristiques de la maladie, comme le phénotype pathologique moteur dans un modèle de souris transgénique qui exprime l'*OPTN* mutée (Gleason et al., 2011) ou encore un modèle de poisson zèbre dans lequel l'expression de l'*OPTN* a été supprimée (Paulus et Link, 2014).

1.3.5 La SLA liée à l'*UBQLN2* (ALS 15)

La SLA liée aux mutations du gène *UBQLN2*, ainsi que les modèles de SLA liée à l'*UBQLN2*, sont présentés dans le paragraphe « 2 La SLA liée à l'*UBQLN2* ».

1.3.6 La SLA liée à *C9ORF72* (FTDALS 1)

En 2011, des expansions anormales de la répétition de l'hexanucléotide GGGGCC (G_4C_2) ont été identifiées dans l'intron 1 du gène *C9ORF72* (chromosome 9 open reading frame 72) chez des patients atteints de SLA et/ou de DFT (DeJesus-Hernandez et al., 2011). A ce jour, cette mutation est à l'origine du plus grand nombre de formes familiales de SLA/SLA-DFT (SLA : 39,3%, SLA-DLFT : 86%) et de formes sporadiques de SLA et/ou DFT (SLA : 7%, SLA-DLFT : 6%, DFT : 6%) pour de nombreux pays comme les Etats-Unis, l'Australie et les pays européens (Zou et al., 2017 ; Gijssels et al., 2012 ; Majounie et al., 2012). La SLA liée à *C9ORF72* fait partie des nombreuses maladies génétiques neurologiques ou neuromusculaires engendrées par la présence de l'Expansion d'une Répétition de Nucléotides (ERN) dans le génome. Le nombre d'hexanucléotides (G_4C_2) chez les patients atteints de SLA-DFT est estimé entre 700 et 1600 contrairement aux individus sains qui ne présentent qu'entre 2 et 23 répétitions (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Le gène *C9ORF72* code pour la protéine C9ORF72 qui est notamment impliquée dans la régulation de la voie

autophagique (Sullivan et al., 2016 ; Sellier et al., 2016 ; Yang et al., 2016) et pourrait également intervenir dans le trafic endosomal (Farg et al., 2014).

Trois transcrits, les variants 1 à 3, sont produits par épissage alternatif du gène *C9ORF72* qui sont présents dans la plupart des tissus dont le cerveau (cytoplasme des neurones). Le variant 1 code pour l'isoforme b (courte), les variants 2 et 3 codent pour l'isoforme a (longue). Chez les patients souffrant de SLA-DFT, ces expansions anormales entraînent une diminution significative de la quantité des 3 variants d'ARNm produits dans différentes régions du SNC (cortex moteur, cervelet, moelle épinière) par rapport aux individus sains (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Donnelly et al., 2013; Waite et al., 2014). Cela se traduit par une réduction significative de la quantité de l'isoforme longue dans le cortex frontal (SLA ou SLA-DFT) et temporal (SLA-DFT) mais pas dans le cortex moteur ni dans le cervelet. En revanche, l'isoforme courte est présente en quantité significativement augmentée dans les régions corticales dans les cas de SLA (Xiao et al., 2015).

Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la perte de fonction de la protéine *C9ORF72*. D'une part, l'expansion de la répétition de l'hexanucléotide (G_4C_2) entraînerait des modifications épigénétiques locales importantes induisant alors une diminution de l'utilisation du promoteur endogène de *C9ORF72*. En revanche, les promoteurs alternatifs contenant moins de sites d'initiation à la transcription et situés entre le promoteur endogène et l'expansion (G_4C_2)_n seraient davantage utilisés (Sareen et al., 2013). D'autre part, l'ERN pourrait être responsable de la formation de structures secondaires et tertiaires (exemples : structures en épingles à cheveux, G-quadruplexes antiparallèles ou parallèles, motif-I, boucles R) créant une instabilité du génome (**figure 7**). L'activité des ARN polymérases, notamment, pourrait ainsi être perturbée durant l'initiation ou l'élongation de la transcription, conduisant à la formation de transcrits tronqués ou avortés, et/ou à une réduction de leur quantité. Une transcription bidirectionnelle a également été rapportée dans différentes maladies liées à la présence d'ERN. Les séquences ERN riches en GC dans le gène *C9ORF72* pourraient donc conduire à la formation de transcrits abortifs courts par transcription bidirectionnelle, pouvant agir comme des ARNsi en réprimant l'expression du gène *C9ORF72* (**figure 7**). De plus, la présence de structures de type G-quadruplexe sur les transcrits pourraient perturber leur traduction et produire alors des protéines contenant des répétitions dipeptidiques (DPR : Dipeptide Protein Repeat) qui ont été observées au sein d'inclusions dans les cellules du SNC (Haeusler et al., 2016).

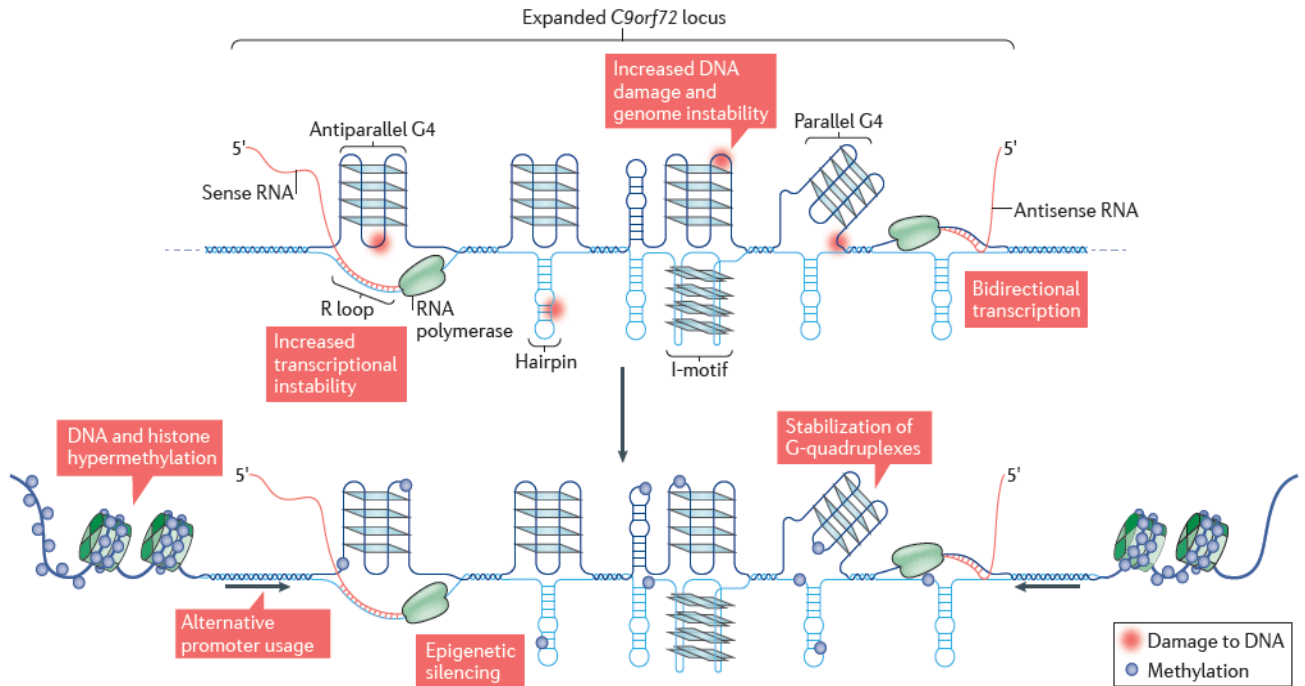


Figure 7: Représentation schématique des structures secondaires et tertiaires perturbant la transcription du gène *C9ORF72* (d'après Haeusler et al., 2016).

L'expansion de l'hexanucléotide G_4C_2 pourrait aussi entraîner un mécanisme de gain de fonction toxique par la production de foyers d'ARN (ou agrégats d'ARN) dans le noyau des cellules du SNC (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Plusieurs analyses histologiques *post-mortem* sur tissu de patients porteurs de la mutation ont mis en évidence la présence, en grande quantité, de **foyers d'ARN** principalement localisés dans le noyau des neurones du cortex frontal, de l'hippocampe, du cervelet et de la moelle épinière (MNs périphériques) (DeJesus-Hernandez et al., 2011 ; Lagier-Tourenne et al., 2013). Ils ont également été observés, mais en quantité plus faible, dans les astrocytes, les cellules microgliales et les oligodendrocytes (Lagier-Tourenne et al., 2013 ; Mizielinska et al., 2013). La transcription bidirectionnelle du gène *C9ORF72* muté est à l'origine de la production de transcrits antisens *C9ORF72* portant l'expansion $(C_2G_4)_n$, qui s'accumulent dans les neurones et forment ces foyers nucléaires (Zu et al., 2013). Le rôle des foyers d'ARN dans la pathogénèse n'a pas encore été clairement démontré. En effet, certaines études montrent que leur formation ne s'accompagne pas de phénotype neurodégénératif (Peters et al., 2015), voire même d'aucun phénotype pathologique (Gami et al., 2015), suggérant que les mécanismes de gain de fonction des ARN *C9ORF72* ne suffiraient pas à eux seuls à conduire à une neurodégénérescence.

Plusieurs études ont mis en évidence la séquestration de protéines dans les foyers d'ARN C9ORF72, ayant la propriété de se lier à l'ARN, comme hnRNP A2/B1 (heterozygous nuclear ribonucleoprotein A2/B1) connue pour interagir avec les séquences répétées riches en C/G des ARN. La dérégulation de hnRNP A2/B1 peut entraîner la formation de foyers d'ARN dans d'autres maladies neurodégénératives comme FXTAS. De plus, des études ont montré son interaction directe avec la protéine TDP-43 (Buratti et al., 2005; Sofola et al., 2007).

Comme dans beaucoup de formes familiales et sporadiques de la SLA, la protéinopathie TDP-43 est observée dans les cas de SLA-DFT liée à C9ORF72 où la protéine TDP-43, qui est principalement nucléaire en condition normale, se retrouve délocalisée dans le cytoplasme sous forme d'inclusions. La localisation de ces inclusions cytoplasmiques dans les différentes régions du SNC est fortement liée au phénotype pathologique. En effet, les inclusions majoritairement situées dans le cytoplasme des neurones périphériques de la moelle épinière sont plutôt associés à la pathologie de la SLA. En revanche, les inclusions essentiellement retrouvées dans le cytoplasme et les neurites des neurones du néocortex et des cellules granulaires du gyrus denté (hippocampe) sont plutôt associées à la DLFT-TDP (Dégénérescence Lobaire Fronto-Temporale avec protéinopathie TDP-43). D'autres inclusions localisées dans le cytoplasme et les neurites des neurones de la couche granulaire du cervelet sont constituées d'ubiquitine mais pas de TDP-43 (DeJesus-Hernandez et al., 2011).

Actuellement, la corrélation entre la présence de foyers d'ARN et la protéinopathie TDP-43 est difficile à établir car seulement 30 à 60% des cellules avec des foyers d'ARN montrent une délocalisation de TDP-43. De même que la proportion de cellules avec des foyers d'ARN contenant des inclusions positives pour p62 (mais négatives pour TDP-43) est inférieure à 20% (Mizielinska et al., 2013). Ainsi, l'expansion anormale de l'hexanucléotide G₄C₂ confère **un gain de fonction** se traduisant par la formation de foyers d'ARN sens et d'ARN antisens de C9ORF72 avec une délocalisation/agrégation de TDP-43 dans le cytoplasme.

Modèles murins de la SLA liée à C9ORF72

Une dizaine de modèles animaux ont été créés suivant différentes stratégies. Le premier modèle a été généré chez la souris et porte des répétitions de 80 G₄C₂ en amont d'un promoteur spécifique des cellules du prosencéphale. Seules des inclusions positives pour l'ubiquitine ont été détectées (pas d'inclusion positive pour TDP-43 ni de DPR) (Hukema et al., 2014). L'absence de neurodégénérescence et de réduction de la survie chez un modèle de souris KO pour le gène C9ORF72, suggère que la perte de fonction de C9ORF72 ne suffit pas pour provoquer la maladie (Koppers et al., 2015). Plusieurs modèles murins portant un Chromosome Bactérien Artificiel (CBA)

avec des répétitions allant de 100 à 1000 G₄C₂, présentent des foyers nucléaires d'ARN et des DPR dans les neurones et les cellules gliales. Néanmoins, leurs phénotypes comportemental et moteur sont normaux (Peters et al., 2015 ; O'Rourke et al., 2015). Ainsi, le nombre de répétitions de l'hexanucléotide G₄C₂ dans ces modèles pourraient être suffisant pour provoquer une accumulation d'ARN mais pas un dysfonctionnement cellulaire conduisant à un phénotype moteur. Deux autres modèles murins ont également été générés avec un CBA. Le premier, portant des répétitions de 500 G₄C₂, présente des foyers d'ARN, une accumulation de DPR cytosoliques et des déficiences cognitives à l'âge de 12 mois (Jiang et al., 2016). Le deuxième, portant des répétitions de 450 G₄C₂, développent davantage de caractéristiques pathologiques de la SLA liée à C9ORF72, à savoir une accumulation d'ARN, des inclusions positives pour TDP-43, une perte de MNs, une dénervation des muscles, un comportement d'anxiété, une paralysie et une réduction de la survie (Liu et al., 2016).

Chez la Drosophile, plusieurs modèles ont également été créés mais aucun d'eux ne récapitule les différentes caractéristiques de cette forme de SLA. Par exemple, deux modèles portant des répétitions allant de 36 à 103 G₄C₂ ou de 160 G₄C₂, présentent des foyers d'ARN et des DPR causant une réduction de la survie mais pas de phénotype pathologique. Il a été suggéré, dans ces deux modèles, que les DPR sont plus toxiques pour les cellules que les foyers d'ARN (Tran et al., 2015 ; Mizielinska et al., 2014). La délétion du gène *alfa-1* (*ok3062*), orthologue de C9ORF72 chez *C.elegans*, conduit à un phénotype moteur (Therrien et al., 2013). De plus, le croisement de ce modèle *alfa-1* (*ok3062*) avec un modèle *C.elegans* TDP-43^{A315T} aggrave le phénotype moteur. En revanche, le croisement du modèle *alfa-1* (*ok3062*) avec un modèle *C.elegans* FUS^{S54Δ} ne l'aggrave pas (Ciura et al., 2013).

Les différents modèles animaux générés jusqu'à présent ne permettent pas d'affirmer que la diminution de l'expression de C9ORF72 causée par l'ERN, entraîne une neurodégénérescence dans le cerveau et la moelle épinière. Par exemple, chez la souris adulte, présentant une forte homologie de séquence avec le gène C9ORF72 humain (98%), aucune caractéristique neuropathologique, ni trouble du comportement n'a pu être observé malgré une réduction significative du niveau d'ARN C9ORF72 dans le cerveau et la moelle épinière (provoquée par traitement avec des oligonucléotides antisens) (Lagier-Tourenne et al., 2013). De même que l'extinction de C9ORF72 dans les neurones et les cellules de la glie chez des souris ne conduit pas à une dégénérescence des MNs, à des dysfonctionnements moteurs ni à une réduction de leur survie (Koppers et al., 2015).

1.3.7 La SLA liée à *SQSTM1* (FTDALS 3)

Le gène *séquestosome 1* (*SQSTM1*) est localisé sur le locus 5q35 et code pour la protéine SQSTM1 (ou p62). Cette protéine, de 62kDa et constituée de 440 acides aminés, est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme les différentes voies de signalisation impliquées dans la survie, la mort, l'inflammation, la différenciation et le métabolisme cellulaire (Seibenhener *et al.*, 2007). Elle joue également un rôle important dans le processus d'autophagie puisqu'elle est impliquée dans le recrutement et le positionnement des protéines ubiquitinylées vers le lysosome, assurant ainsi leur dégradation et leur recyclage. P62 assure aussi le transport des protéines ubiquitinylées vers la voie de dégradation par le protéasome (Seibenhener *et al.*, 2004) Une caractéristique de p62 est de se lier à la protéine autophagique MAP1-LC3 (Microtubule-Associated Protein 1-Light Chain 3) par son domaine LIR (LC3 Interacting Region), et d'interagir avec son domaine UBA (Ubiquitin-Associated domain) avec les substrats cellulaires ubiquitinylés (figure 8) (Layfield *et Hocking*, 2004).

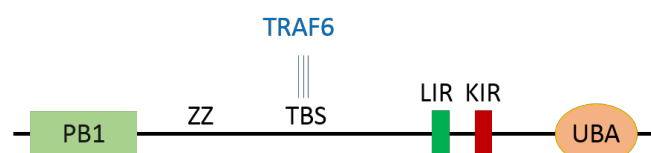


Figure 8: Représentation schématique de la protéine p62.

La protéine p62 renferme plusieurs domaines spécifiques : un domaine Protein Binding 1 (PB1), un domaine Zinc finger (ZZ), un domaine TRAF6 Binding (TBS), un domaine LC3 Interacting Region (LIR), et un domaine Ubiquitin-Associated Domain (UBA) (adapté de Rea *et al.*, 2014).

Il y a de plus en plus d'évidences que la protéine p62 soit impliquée dans la neurodégénérescence. En effet, elle a été précédemment liée aux phénotypes neurodégénératifs à travers sa localisation dans des agrégats cytoplasmiques ubiquitinylés dans de nombreuses maladies, comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Salminen *et al.*, 2012 ; Geetha *et al.*, 2012). D'autres études ont également révélé la présence d'inclusions de p62 chez les patients atteints de SLA ou de SLA-DFT portant l'expansion de G₄C₂ dans le gène *C9ORF72* (Kwok *et al.*, 2014). Les mutations du gène *SQSTM1* sont généralement associées à la maladie osseuse de Paget, maladie caractérisée par une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes conduisant à des anomalies dans l'architecture de l'os (Smith, 1999). Récemment, plusieurs mutations dans *SQSTM1* ont été identifiées dans des cas de SLA-DFT suggérant un rôle pour ce gène dans la pathogénèse de ces maladies. Les mutations de *SQSTM1*

restent relativement rares (3%) chez les patients souffrant de SLA-DFT, comparativement aux mutations de *TARDBP* et *FUS* (Rubino et al., 2012).

Modèles animaux pour la SLA liée à *SQSTM1*

Les modèles *in vivo* créés pour la SLA liée à *SQSTM1* permettent d'étudier spécifiquement l'implication des voies de dégradation protéique par autophagie et par le protéasome (Narendra et al., 2010 ; De Castro et al., 2013 ; Seibenhener et al., 2013). Chez la Drosophile, l'extinction du gène orthologue à *SQSTM1* conduit à un dysfonctionnement mitochondrial et une accumulation d'ADN mitochondrial, accompagnés de troubles moteurs (Pimenta de Castro et al., 2012 ; De Castro et al., 2013). Un modèle de souris knock-out pour *SQSTM1* présente également un dysfonctionnement mitochondrial entraînant une réduction de la production d'ATP. Cette protéine joue donc un rôle essentiel pour le bon fonctionnement des mitochondries, qui sont elles-mêmes essentielles pour les neurones car elles sont la principale source d'ATP (en raison de la glycolyse limitée dans ces cellules) (Lee et Shin, 2011 ; Kwon et al., 2012 ; Seibenhener et al., 2013). De plus, un nombre croissant d'études suggère que le dysfonctionnement mitochondrial joue un rôle important dans la pathogénèse de la SLA et de la DFT (Lopez-Gonzalez et al., 2016 ; Stoica et al., 2014 ; Stoica et al., 2016).

1.3.8 La SLA liée à l'*UBQLN4*

Depuis quelques années, l'identification de mutations dans les gènes codant pour des ubiquilines suggère que celles-ci joueraient un rôle important dans la pathogénèse des maladies du MN. Effectivement, plusieurs mutations dans le gène *UBQLN2*, codant pour l'ubiquiline 2, ont été mises en évidence chez des patients atteints de SLAf, accompagnée ou non de DFT (Deng et al., 2011). La description de cette mutation sera présentée dans le paragraphe suivant et de façon plus approfondie, car l'étude de la SLA liée aux mutations de l'*UBQLN2* représente l'objet principal de ma thèse.

De façon intéressante, la mutation E54D dans le gène *UBQLN1* (codant pour l'ubiquiline 1^{E54D}) a été rapportée chez un patient atteint d'une maladie atypique du MN concordant avec le syndrome de Brown-Vialetto-Van Laere (González-Pérez et al., 2012). Ces découvertes ont conduit Edens et ses collègues à rechercher si l'ubiquiline 4, qui montre une forte homologie de séquence avec l'ubiquiline 2, pouvait être également impliquée dans la SLA. Pour cela, un screening des 11 exons du gène *UBQLN4* a été effectué à l'aide d'amorces sur un grand nombre de patients (267 cas de SLAf et 411 cas de SLAs). Une mutation faux-sens dans l'exon 3 de ce gène (c.269A>C) a ainsi été identifiée dans un cas familial de SLA, conduisant à la substitution d'un acide aspartique par une alanine (p.D90A) (Edens et al., 2017).

Des études ont montré que les neurones qui expriment l'ubiquiline 4^{D90A} ont un Système Ubiquitine-Protéasome (SUP) déficient, se traduisant par une réduction du renouvellement des protéines. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que la mutation D90A soit à proximité du domaine de liaison au protéasome (UBL: Ubiquitine-Like domain), pouvant ainsi compromettre l'interaction de l'ubiquiline 4^{D90A} avec le protéasome. L'expression de l'ubiquiline 4^{D90A} conduit également à une accumulation de β -caténine et une morphogénèse anormale des MNs, ce qui suggère que l'ubiquiline 4^{D90A} peut affecter le développement des MNs par dérégulation de voie de signalisation dépendante de la β -caténine (Edens et al., 2017). En effet, cette dernière est essentielle pour la régulation de multiple aspects du développement neuronal comme la croissance des neurites (Votin et al., 2005), l'orientation axonale (Avile's et Stoeckli, 2016; Maro et al., 2009) et l'innervation ciblée (Salinas et Zou, 2008; Wu et al., 2012). De plus, il a été démontré précédemment que la voie du SUP assure la dégradation de la β -caténine et que la perturbation de cette voie entraînerait une accumulation de la β -caténine (Aberle et al., 1997). Ainsi, la perturbation du SUP et l'accumulation de β -caténine conduisant à la morphogénèse anormale des MNs, pourraient être responsable d'un défaut de transmission du potentiel d'action et de l'innervation ciblée rendant les MNs susceptibles à la dégénérescence (Edens et al., 2017).

Du fait que cette forme de SLAf ait été découverte tout récemment, aucun modèle animal n'a encore été décrit.

1 La SLA liée à l'UBQLN2

2.1 L'ubiquiline 2

2.1.1 Le gène *UBQLN2* et la protéine ubiquiline 2

L'ubiquiline 2 est une protéine de 66kDa appartenant à la famille des ubiquilines qui comprend les ubiquilines 1, 2, 3, 4 et L chez l'Homme et les ubiquilines 1 à 5 et L chez la souris. L'ubiquiline 2 est codée par le gène *UBQLN2*, localisé sur le chromosome X (Xp11.21). Ce gène ne contient qu'un seul exon de 1875pb sans séquence intronique (**figure 9 : A**) (Kaye et al., 2000 ; Deng et al., 2011). L'ubiquiline 2 est présente dans un grand nombre d'espèces comme les levures, les rongeurs, le chimpanzé et l'Homme (Zhang et al., 2014).

2.1.2 Localisation cellulaire

L'ubiquiline 2 est principalement localisée au niveau du cytosol (Zhang et al., 2009) mais elle peut également être associée au réticulum endoplasmique et à la membrane plasmique (Wu et al., 1999). Certaines études ont montré sa capacité à être transloquée dans le noyau (Hjerpe et al., 2016). Le niveau d'expression de l'ubiquiline 2 est élevé lorsque la cellule est en phase de

mitose (métaphase à télophase) alors que les cellules non-mitotiques expriment faiblement la protéine (Kleijnen *et al.*, 2000).

2.1.3 Expression tissulaire

L'expression des ubiquilines varie en fonction des tissus. L'ubiquiline 1, par exemple, a une expression ubiquitaire alors que l'ubiquiline 2 est présente dans un grand nombre de tissus mais en quantités très variables. En effet, chez la souris son niveau d'expression est majoritairement plus élevé dans différentes régions du SNC (moelle épinière, amygdale, cortex cérébral, cervelet, striatum dorsal, hippocampe, hypothalamus, hypophyse, noyaux accumbens, bulbes olfactifs) et la prostate. Chez l'Homme, elle est surtout présente dans plusieurs régions du cerveau (amygdale, cortex préfrontal, glande pinéale, hypothalamus, hypophyse, cervelet, lobe occipital), avec un niveau d'expression nettement moins élevé dans la moelle épinière. Des niveaux non négligeables sont aussi observés dans la rétine, la prostate et l'utérus. Contrairement à la forme murine, l'ubiquiline 2 humaine est également retrouvée en grande quantité dans les cellules et les tissus du système immunitaire tels que les lymphocytes T (CD4+ ou CD8+), les cellules NK CD56+, les cellules myéloïdes CD33+, les lymphocytes B CD19+, le thymus et la thyroïde. Quant à l'ubiquiline 4, elle est observée dans un grand nombre de tissus mais en très faible quantité. Enfin, les ubiquilines 3, 5 et L chez la souris et les ubiquilines 3 et L chez l'Homme sont exclusivement exprimées dans les testicules (Marín *et al.*, 2014).

2.1.4 Structure

Comme toutes les ubiquilines, l'ubiquiline 2 possède un domaine **UBL (Ubiquitin-Like domain)** en N-terminal qui se fixe sur la sous-unité 19S du protéasome, et un domaine **UBA (Ubiquitin-Associated domain)** en C-terminal se liant aux chaînes d'ubiquitine présentes sur les protéines destinées à être dégradées par le protéasome (**figure 9 : B**). Il est également possible que le domaine UBA de l'ubiquiline 2 permette d'interagir avec l'autophagosome, comme cela a été démontré pour l'ubiquiline 1 (N'Diaye *et al.*, 2009).

Au centre de la séquence protéique, 4 motifs **Sti1 (Stress induced protein 1)** permettent la liaison de l'ubiquiline 2 au domaine ATPase de la protéine chaperonne HSP70 (Heat Shock Protein 70), lorsque celle-ci est liée aux protéines ubiquitylées étant mal-repliées et donc destinées à être dégradées. Lors d'un stress cellulaire (un choc thermique, par exemple) certaines protéines perdent leur conformation tri-dimensionnelle et peuvent former des agrégats insolubles et toxiques pour la cellule. Pour prévenir cette agrégation, HSP70 et l'ubiquiline 2 sont activées et vont recruter ces protéines toxiques afin qu'elles soient dégradées par le protéasome (Zhang et al., 2014 ; Hjerpe et al., 2016).

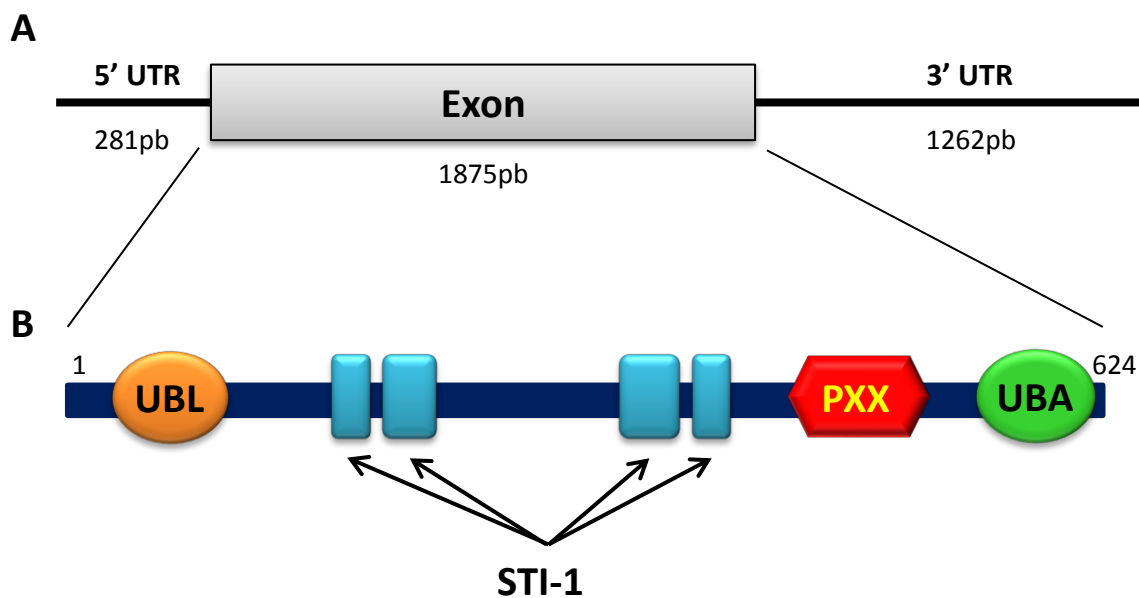


Figure 9: Représentation schématique du gène *UBQLN2* et de la protéine ubiquiline 2 humaine. (A) Le gène *UBQLN2* est localisé sur le chromosome X et ne porte qu'un seul exon codant la protéine ubiquiline 2 (B) qui possède quatre domaines différents ; un « Ubiquitin-Like domain » (UBL), 4 motifs Sti1 (Stress induced protein 1), une région de 12 PXX (P : proline, X : autre acide aminé) répétés en tandem, et un « Ubiquitin-Associated domain » (UBA) (adapté de Zhang et al., 2014).

Contrairement aux autres formes d'ubiquiline, l'ubiquiline 2 possède une région de 12 **PXX** (P : proline, X : autre acide aminé) répétés en tandem, dont la séquence d'acides aminés est fortement conservée chez plusieurs espèces (**figure 9 : B**). Bien que le rôle de cette région ne soit pas encore totalement connu, il semblerait toutefois qu'elle soit impliquée dans les interactions entre protéines (Ball et al., 2005). En effet, les motifs riches en proline sont fréquemment impliqués dans des phénomènes d'association multi-protéiques complexes jouant un rôle dans divers processus cellulaires clés tels que la croissance cellulaire, les réarrangements du cytosquelette, la transcription et la signalisation post-synaptique. Les séquences riches en proline ont tendance à former une hélice de polyproline de type II (PPII) dont la structure ressemble à un prisme triangulaire (**figure 10**). Parmi les domaines protéiques reconnaissant ces structures, les domaines SH3 (Src homology 3) par exemple, ont été identifiés dans un grand nombre de

protéines dans de nombreuses espèces dont l'Homme (332 protéines) et la souris *Mus musculus* (163 protéines). Ces domaines, composés de 60 acides aminés, interviennent dans l'assemblage des protéines et dans la régulation de l'activité protéique. La reconnaissance du domaine SH3 par l'élément PPII est fortement sélective car la proline est une amine secondaire (un seul atome d'hydrogène lié à l'azote) contrairement à tous les autres acides aminés qui sont des amines primaires (deux atomes d'hydrogène liés à l'azote). De plus, les acides aminés constituant les sillons étant très conservés, la spécificité des interactions se fait grâce aux deux boucles variables RT-Src et N-Src (**figure 10**) (Zarrinpar et al., 2003).

Par ailleurs, les séquences 12PXX, spécifiques à l'ubiquiline 2, pourraient conduire à des interactions différentes de celles des autres ubiquilines, ce qui justifierait sa présence en plus des ubiquilines 1 et 4.

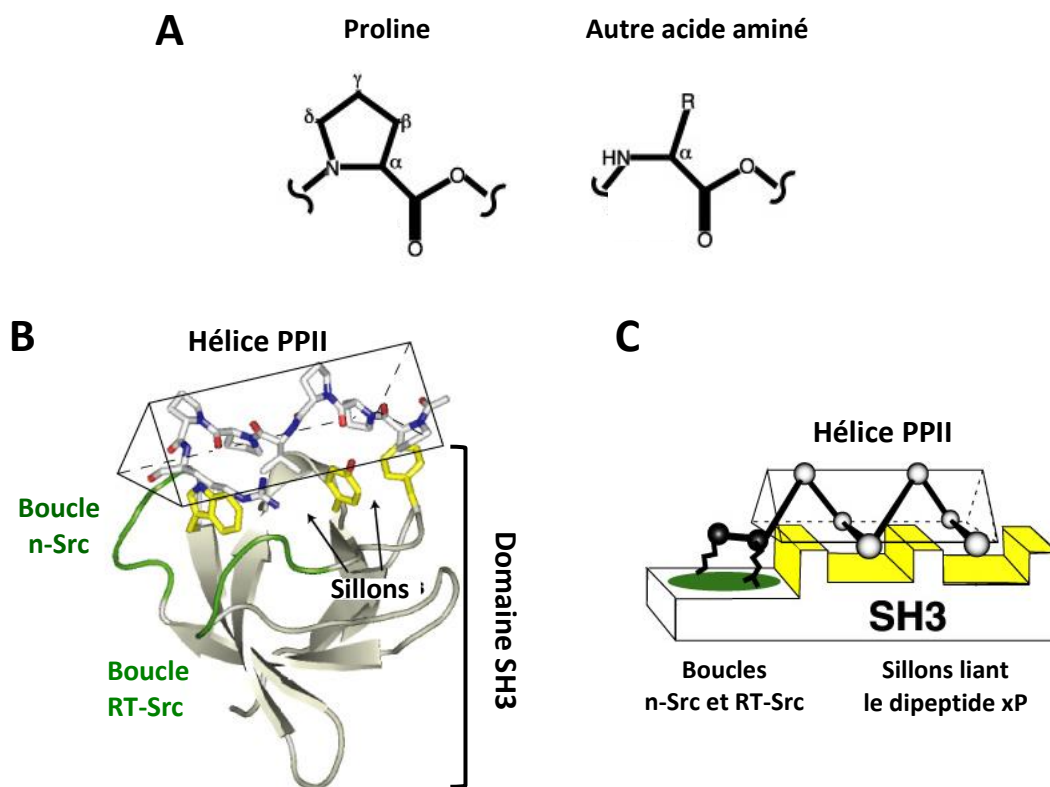


Figure 10: Représentations schématiques de la structure et du mécanisme de liaison des hélices de polyproline de type II (PPII) et des domaines SH3.

(A) La structure chimique de la proline diffère des autres acides aminés (amines primaires) par la présence d'un noyau pyrrolic (4 carbones : α , β , γ , δ et 1 azote : N) qui lui confère une fonction d'amine secondaire. (B) L'hélice PPII est un ligand riche en proline arborant une structure en forme de prisme triangulaire. (B et C) Le domaine SH3, quant à lui, se compose de deux sillons hydrophobes formés par des acides aminés aromatiques (en jaune) et par deux feuillettes β reliés l'un à l'autre de façon antiparallèle et possédant chacun trois brins β . L'interaction se fait au niveau des sillons du domaine SH3 qui se lie chacun à un dipeptide xP de l'hélice PPII. Deux boucles variables RT-Src et n-Src assurent la spécificité des interactions (d'après Zarrinpar et al., 2003).

2.2 Les fonctions de l'ubiquiline 2

2.2.1 Rôle de l'ubiquiline 2 dans le Système Ubiquitine-Protéasome (SUP)

Le **Système Ubiquitine-Protéasome (SUP)** assure la dégradation d'environ 80% des protéines intracellulaires (Pickart, 2001); ce qui en fait la principale voie de dégradation protéique. Elle est destinée aux protéines nucléaires et cytoplasmiques à durée de vie courte, détériorées ou mal repliées (Hershko et Ciechanover, 1998; Kleiger et Mayor, 2014). Le protéasome est impliqué dans une variété de fonctions cellulaires, tels que le contrôle de qualité du protéome, la réponse au stress ou la régulation du cycle cellulaire. Ce processus de dégradation se déroule en deux temps (**figure 11**); les protéines sont d'abord marquées par une chaîne d'ubiquitines, servant de signal de dégradation, puis une fois amenées au protéasome, celui-ci dégrade les protéines en petits peptides grâce à des sites actifs peptidasiques localisés dans le cœur catalytique du protéasome (Finley, 2009). Le protéasome est impliqué dans des protéinopathies caractérisées par la présence anormale d'agrégats de protéines ubiquitinylées dans les cellules. C'est notamment le cas dans certaines maladies neurodégénératives telles que la SLA et les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Zabel et al., 2010; Tanaka et al., 2014).

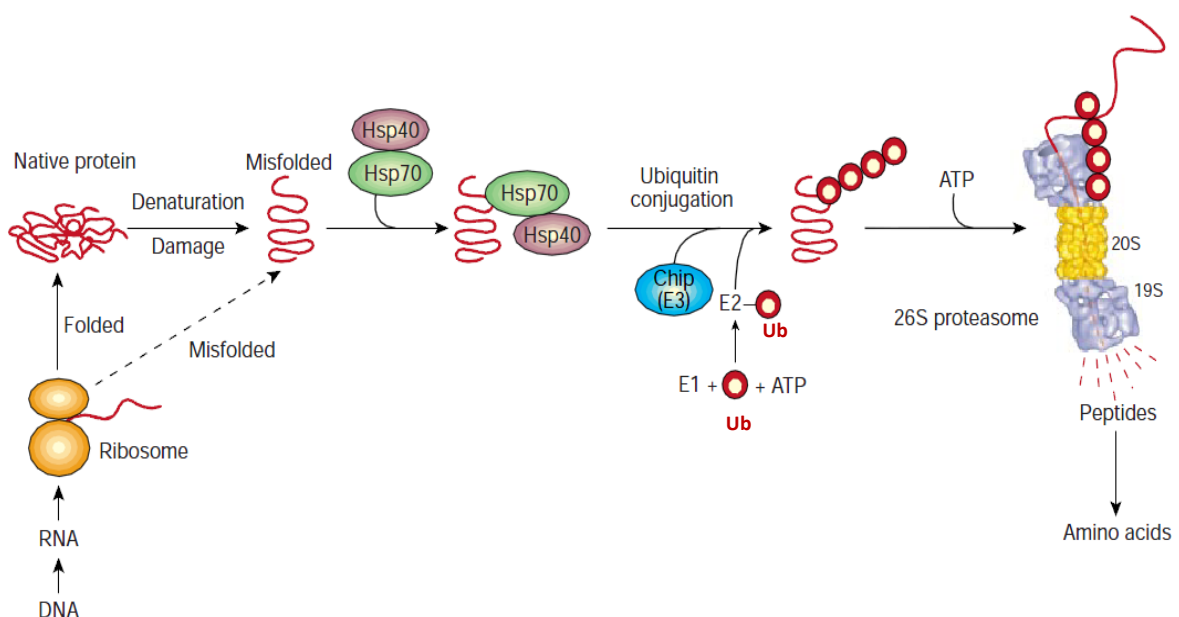


Figure 11 : Représentation schématique de la prise en charge et de la dégradation des protéines mal repliées par le Système Ubiquitine-Protéasome (SUP).

Les protéines mal repliées peuvent être soit des protéines natives qui ont été dénaturées ou détériorées, soit des protéines nouvellement synthétisées pour lesquelles le repliement ne s'est pas fait correctement. En se liant aux domaines hydrophobes, les protéines chaperonnes Hsp70 et Hsp40 favorisent le repliement des nouvelles protéines synthétisées mais peuvent également faciliter la reconnaissance de protéines anormales (mal repliées), conduisant à la fixation d'une chaîne d'ubiquitines. Cette ubiquitinylation se fait grâce à un mécanisme séquentiel enzymatique qui nécessite trois enzymes (E1, E2 et E3 ou Chip). Tout d'abord, l'enzyme E1 active le résidu glycine C-terminal d'une ubiquitine de manière dépendante de l'ATP. L'ubiquitine activée est ensuite transférée vers le site actif d'une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2). Enfin, une ligase d'ubiquitine (E3

ou Chip) lie l'ubiquitine de l'enzyme E2 à un résidu lysine de la protéine mal repliée. En suivant cette cascade enzymatique, d'autres ubiquitines s'ajoutent les unes après les autres à la suite de la première ubiquitine (au niveau d'un résidu lysine de l'ubiquitine) formant ainsi une chaîne d'ubiquitines. Une chaîne d'au moins quatre ubiquitines liées à la lysine 48 est le principal signal de dégradation. La protéine mal repliée polyubiquitinylée est alors reconnue par la sous-unité régulatrice (19S) du protéasome 26S qui élimine la chaîne d'ubiquitines et déplie la protéine. Celle-ci est transférée dans le coeur catalytique (20S) du protéasome, contenant les sites actifs protéolytiques, puis clivée en petits peptides (d'après [Goldberg, 2003](#) ; [Finley et al., 2009](#)).

La voie de **Dégradation des protéines Associées au Réticulum Endoplasmique (DARE)** fait notamment intervenir les protéines du SUP. Le rôle de la voie DARE est d'assurer un contrôle qualité des protéines du Réticulum Endoplasmique (RE), vital pour maintenir l'homéostasie du RE et par conséquent pour la survie cellulaire. Ce système est activé en condition de stress du RE afin d'éliminer les protéines mal repliées qui s'accumulent dans le RE et de ne garder que les protéines correctement repliées. Parmi les différentes protéines intervenant dans cette voie, la protéine membranaire du RE, nommée Ubx8 (Ubiquitin regulatory X domain-containing protein 8) se lie à des protéines du RE mal repliées destinées à être dégradées par le protéasome ([Zhang et al., 2014](#)).

L'ubiquiline 2 intervient dans la dégradation des protéines mal repliées via le SUP (**figure 13 : B**). Son rôle est de recruter les protéines poly-ubiquitinylées, grâce à son domaine UBA qui se lie aux chaînes d'ubiquitines, et de les amener au protéasome en se liant à la sous-unité S5a des complexes régulateurs 19S du protéasome, grâce à son domaine UBL. Ainsi, l'ubiquiline 2 joue un rôle important dans la dégradation des protéines via le SUP en dirigeant les protéines poly-ubiquitinylées du cytosol vers le protéasome ([Walters et al., 2002](#)).

L'ubiquiline 2 est également impliquée dans la voie DARE où elle interagit avec l'Ubx8 dans le but de transloquer les protéines ubiquitinylées du RE, vers le cytosol afin de les amener jusqu'au protéasome (**figure 13 : B**) ([Xia et al., 2014](#)). De plus, l'ubiquiline 2 interagit avec une autre protéine membranaire du RE, surexprimée en condition de stress du RE, la protéine Herp (Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein) ([Kim et al., 2008](#)). L'ubiquiline 2 joue donc un rôle dans la protection des cellules contre le stress du RE en interagissant avec des protéines de la voie DARE, afin d'amener les protéines mal repliées du RE au protéasome pour être dégradées.

2.2.2 Rôle de l'ubiquiline 2 dans l'autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation et de recyclage de diverses macromolécules et organites cellulaires. En prenant en charge les protéines à durée de vie longue, elle intervient de manière complémentaire à la voie du protéasome, qui lui assure la dégradation des protéines à durée de vie courte. La voie autophagique joue un rôle important dans l'homéostasie des

cellules. Elle est également impliquée dans diverses réponses biologiques comme le développement, le stress cellulaire, l'inflammation, la survie cellulaire et le vieillissement. Jusqu'à présent, trois types d'autophagies ont été décrits :

-La micro-autophagie. Elle participe au renouvellement perpétuel des composants cellulaires dans des conditions cellulaires normales (Ahlberg et Glaumann, 1985). Cette voie implique l'invagination de la membrane lysosomale dans le but de séquestrer et dégrader des constituants cytoplasmiques de petite taille par les hydrolases lysosomales (**figure 12**) (De Duve et Wattiaux, 1966). Cette voie est également impliquée dans la dégradation sélective des organites qui ne sont plus nécessaires pour la cellule (Farré et Subramani, 2004).

-L'Autophagie Médiée par les protéines Chaperonnes (AMC). Elle est présente dans tous les tissus et fonctionne dans les conditions cellulaires physiologiques, mais son activité est maximale dans des conditions de stress (Massey et al., 2006). Lors de privation nutritionnelle, si la macro-autophagie n'est pas suffisante pour assurer la dégradation aléatoire de composants intracellulaires, fournissant des acides aminés nécessaires pour la synthèse de nouvelles protéines, alors l'AMC intervient en renfort (Massey et al., 2006). De plus, elle assure de manière sélective la dégradation de protéines cytosoliques altérées présentant des séquences consensus KFERQ. Ces protéines sont alors prises en charge par la protéine chaperonne cytosolique HSC70 (Heat Shock Cognate protein 70) dont le rôle est d'assurer leur dépliement et leur transport jusqu'au récepteur membranaire LAMP-2A (Lysosomal Associated Membrane Protein type 2A) présent à la surface du lysosome pour être ensuite dégradées par les protéases lysosomales (**figure 12**) (Kaushik and Cuervo, 2012). Les modifications du fonctionnement de cette voie autophagique conduit au développement de certaines pathologies, dont des formes familiales de la maladie de Parkinson (Cuervo et al., 2004).

-La macro-autophagie. Elle intervient préférentiellement en conditions de stress. Son rôle est double, soit elle permet la génération de macromolécules essentielles et d'énergie lors de privation nutritionnelle (Mizushima et al., 2005), soit elle permet l'élimination des composants intracellulaires altérés. Cette voie agit dans de nombreux tissus et est notamment essentielle pour assurer l'homéostasie neuronale (Hara et al., 2006 ; Komatsu et al., 2006). La macro-autophagie assure principalement la dégradation de protéines à durée de vie longue et d'agrégats protéiques (Komatsu et al., 2012). Pour cela, une double membrane appelée phagophore se forme dans le cytosol puis va séquestrer ces protéines ou ces agrégats en formant une vésicule nommée autophagosome (**figure 12**). Ce dernier fusionne ensuite avec le lysosome, formant ainsi un autolysosome où les protéines et les agrégats sont alors dégradés par les hydrolases lysosomales.

Des études ont montré qu'un dysfonctionnement de cette voie autophagique peut être associé à diverses pathologies comme des myopathies sévères (Nishino, 2003) et des troubles neurodégénératifs (la SLA, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, par exemples) (Rubinsztein et al., 2005 ; Chen et al., 2012).

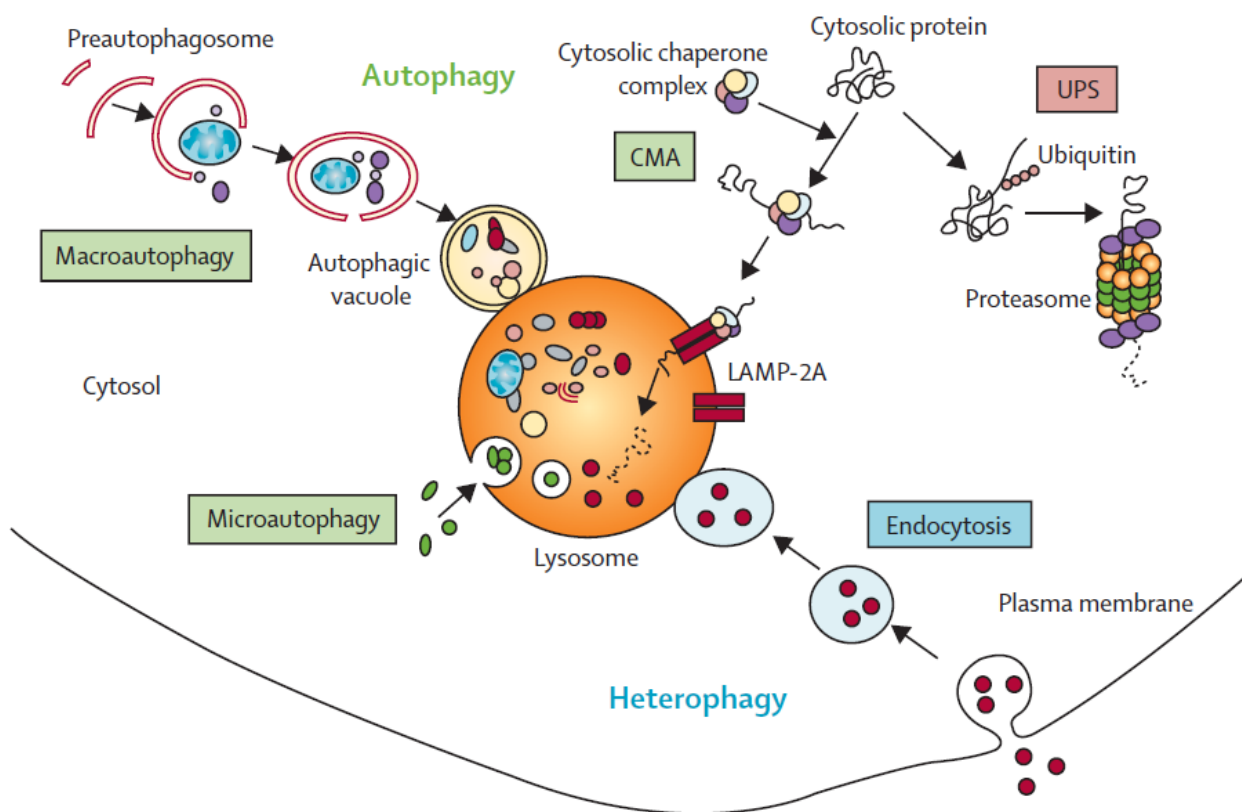


Figure 12 : Le système protéolytique.

Les protéines, devant être dégradées, sont internalisées dans des lysosomes à partir du milieu extracellulaire (hétérophagie) ou de l'intérieur de la cellule (autophagie). La voie hétérophagique la mieux décrite est l'endocytose. Il existe trois différents types d'autophagie: macro-autophagie, micro-autophagie et autophagie médiée par les protéines chaperones (CMA). Dans la macro-autophagie, les composants intracellulaires sont séquestrés par une membrane limitante formant une vacuole autophagique qui fusionne ensuite avec les lysosomes. En micro-autophagie, les substrats sont directement internalisés par des invaginations de la membrane lysosomale. Contrairement à cette dégradation "en vrac", lors de la CMA, les substrats protéiques sont transférés dans les lysosomes les uns après les autres en se liant au récepteur lysosomal (LAMP-2A). Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est l'autre voie majeure pour la dégradation des protéines intracellulaires. Les substrats protéiques se lient à l'ubiquitine et sont pris en charge par le protéasome (d'après Martinez-Vicente et Cuervo, 2007).

Les niveaux intracellulaires des ubiquilines 1 et 2 pourraient être maintenus par deux différentes formes d'autophagie. En effet, l'ubiquiline peut être dégradée par la voie macro-autophagique mais aussi par la voie de l'AMC (**figure 13 : A**). Des études *in vitro* ont montré que le blocage de l'AMC entraîne, par exemple, une activation de la macro-autophagie. Autrement dit,

les voies de l'AMC et de la macro-autophagie pourraient agir de façon complémentaire afin de réguler les niveaux intracellulaires d'ubiquilines (Rothenberg et al., 2010).

Des études ont démontré que les ubiquilines 1 et 2 sont impliquées dans la voie macro-autophagique, notamment pour la conversion du LC3-I (forme cytosolique) en LC3-II (forme liée à la membrane) ainsi que pour la maturation des autophagosomes en autolysosomes (N'Diaye et al., 2009 ; Rothenberg et al., 2010) (figure 13 : A). La déplétion des ubiquilines 1 et 2 rend les cellules plus susceptibles à une mort induite par privation de nutriments et retarde le transport de l'autophagosome aux lysosomes (N'Diaye et al., 2009).

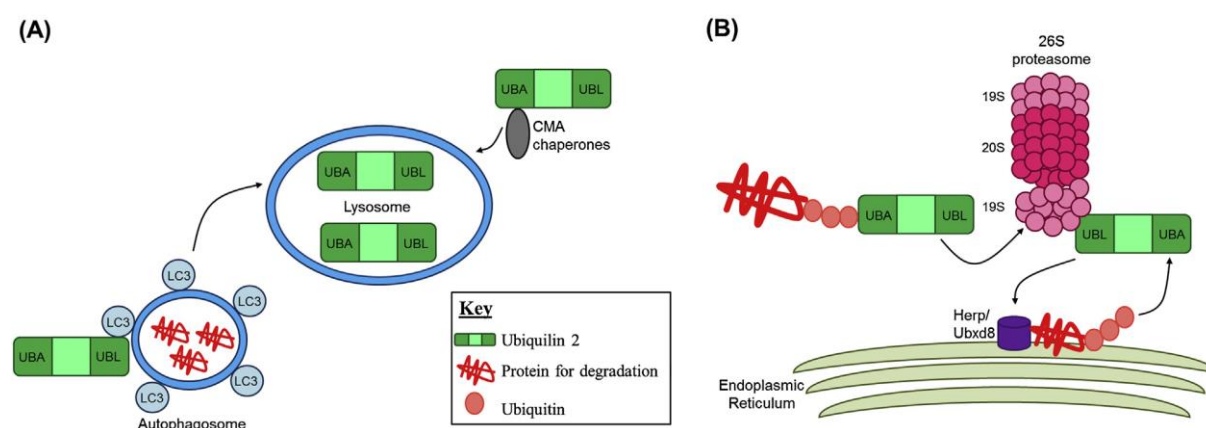


Figure 13 : Représentation schématique de l'implication de l'ubiquiline 2 dans la voie macro-autophagique et la voie de Dégradation des protéines Associées au Réticulum Endoplasmique (DARE).

(A) L'ubiquiline 2 intervient dans la modulation de la macro-autophagie. Elle est elle-même dégradée par les voies macro-autophagique et de l'AMC. (B) L'ubiquiline 2 recrute les protéines du cytosol et du RE afin de les diriger jusqu'au protéasome pour leur dégradation. Elle peut aussi médier l'activité des protéines du RE, impliquées dans la voie de DARE telles que Herp et Ubx8. UBL: « Ubiquitin-like domain »; UBA: « Ubiquitin-Associated domain »; Ubx8: Ubiquitin regulatory X domain-containing protein 8; Herp: Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein; LC3: Light Chain 3; CMA: Chaperone Mediated Autophagy (d'après Zhang et al., 2014).

2.3 La SLA liée aux mutations dans le gène UBQLN2

Récemment, le gène *UBQLN2* a été identifié par Deng et ses collaborateurs, comme étant lié à la SLAf accompagnée ou non de démences. Cette découverte s'est faite grâce à une étude réalisée sur 5 familles différentes touchées par la SLA (40 individus au total) pour lesquelles la maladie se transmet par un mode dominant avec une pénétrance réduite chez les femmes et sans transmission de père en fils (Deng et al., 2011).

2.3.1 Les mutations de l'*UBQLN2* dans la SLA

Deng et ses collaborateurs ont associé le gène *UBQLN2* à la SLA avec ou sans démence par la mise en évidence de 5 mutations faux-sens dans la région PXX, toutes caractérisées par le

remplacement d'une proline par un autre acide aminé (**figure 14**). Par exemple, une cytosine a été substituée par une adénine en position 1490 de l'ADN codant (c.1490C>A), entraînant le changement de la proline en histidine en position 497 de la protéine (p.P497H). Les quatre autres mutations sont les substitutions suivantes : c.1489C>T (p.P497S), c.1516C>A (p.P506T), c.1525C>T (p.P509S) et c.1573C>T (p.P525S). Parmi ces mutations, celles nommées P497H et P506T montrent une pénétrance complète, autrement dit, leur présence est toujours associée à la pathologie chez les individus étudiés (Deng *et al.*, 2011).

Par la suite, différentes études ont référencé d'autres mutations faux-sens responsables de SLAf, localisées dans/ou à proximité de la région PXX ou bien dans le dernier domaine STI-1 de la protéine (**figure 14**). De plus, des mutations faux-sens ont également été mises en évidence dans des cas sporadiques de la maladie, situées dans un des domaines STI-1 ou dans des domaines non fonctionnels de la protéine (**figure 14**).

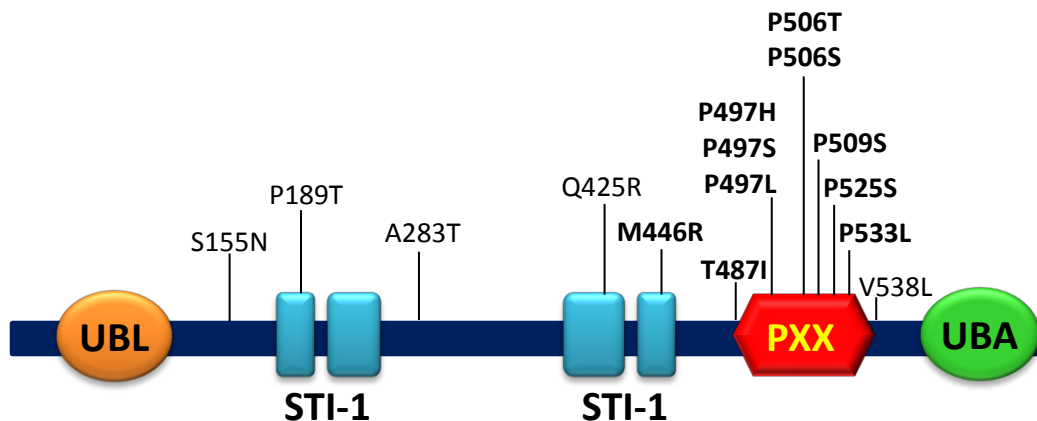


Figure 14: Schéma représentatif des mutations de l'ubiquiline 2 identifiées chez des patients atteints de SLA avec ou sans démence.

Les mutations identifiées dans les cas de SLA familiales (représentées en gras) sont des mutations faux-sens principalement localisées dans le motif PXX, entraînant le remplacement d'une proline par un autre acide aminé. Deux autres mutations ont été référencées; la substitution d'acide aminé M446R se situe dans un domaine STI-1 et la substitution T487I en dehors d'un domaine fonctionnel connu. Il faut noter que le patient porteur de la mutation M446R présente aussi une mutation dans le gène *OPTN* qui est également lié à la SLAf. De même qu'une mutation dans le gène *TARDBP*, impliqué aussi dans des cas de SLAf, a été identifiée chez le patient porteur de la mutation T487I. Cinq cas de SLA sporadiques sont dus à une mutation faux-sens localisée dans un des domaines STI-1 ou en dehors des domaines fonctionnels de la protéine. Des signes de démence ont été diagnostiqués chez certains patients porteurs des mutations P497H, P497S, P506T, P506S (d'après Deng *et al.*, 2011 ; Synofzik *et al.*, 2012 ; Williams *et al.*, 2012 ; Daoud *et al.*, 2012 ; Vengoechea *et al.*, 2013 ; Gellera *et al.*, 2013 ; Fahed *et al.*, 2014).

2.3.2 Les caractéristiques physiopathologiques de la SLA liée à l'*UBQLN2*

Phénotype

Le diagnostic des patients présentant une SLA liée aux mutations de l'*UBQLN2* est basé sur les critères référencés d'EL-Escorial (Deng *et al.*, 2011 ; Daoud *et al.*, 2012 ; Gellera *et al.*, 2013).

Notamment, l'âge auquel apparaissent les premiers symptômes est très variable, allant de 16 à 71 ans, avec une différence significative entre les hommes et les femmes (moyennes de 33,9 et 47,3 ans respectivement) et non en ce qui concerne la durée de la maladie (moyennes de 43,1 et 48,5 ans respectivement). A 70 ans, la pénétrance des 5 premières mutations identifiées est estimée à 90%. (Deng *et al.*, 2011).

Parmi les patients porteurs du gène *UBQLN2* muté, certains souffrent de démences similaires au type de **Démences Fronto-Temporales (DFT)** qui se caractérisent notamment par des troubles du comportement et de la fonction exécutive (Deng *et al.*, 2011 ; Vengoechea *et al.*, 2013 ; Gellera *et al.*, 2013 ; Fahed *et al.*, 2014). Le degré de sévérité varie suivant les individus et selon les différents stades de la maladie. Les signes de démence apparaissent progressivement et précèdent parfois les symptômes moteurs observés chez tous ces patients (Deng *et al.*, 2011).

Au début de la maladie, les formes bulbaire et spinale de la SLA peuvent aussi bien être observées dans des cas familiaux et que sporadiques de SLA et ne dépendent pas de la localisation de la mutation dans le gène *UBQLN2* (Synofzik *et al.*, 2012 ; Williams *et al.*, 2012 ; Gellera *et al.*, 2013).

Au niveau histologique

Des analyses *post mortem*, sur des échantillons de moelle épinière, ont mis en évidence une perte d'axones dans le tractus cortico-spinal ainsi qu'une **perte de neurones** dans les cornes ventrales chez des patients exprimant l'ubiquiline 2^{P497H} ou l'ubiquiline 2^{P506T} (**figure 15 : A et B**). Ces individus montrent également une neuro-inflammation dans les cornes ventrales se manifestant par une astrocytose, autrement dit, une prolifération excessive et anormale des astrocytes appelée **astrogliose** (**figure 15 : C**).

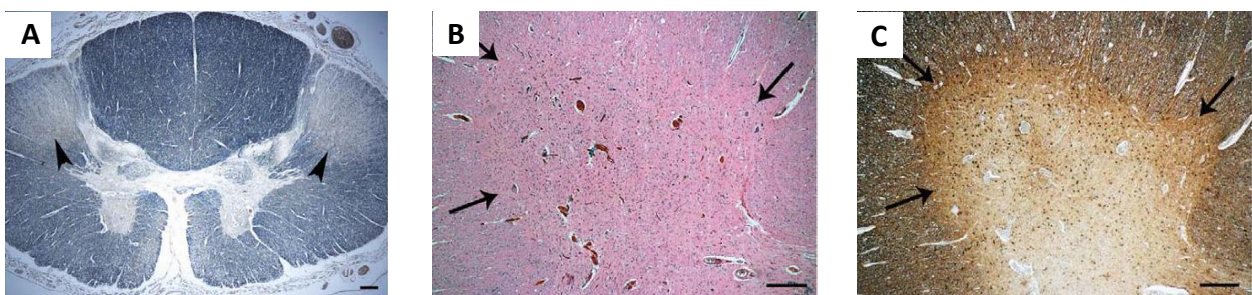


Figure 15: Photos représentatives de l'atteinte de la moelle épinière dans la SLA liée à l'*UBQLN2*.

Les analyses suivantes ont été réalisées sur des coupes de moelle épinière provenant d'un patient exprimant l'ubiquiline 2^{P506T}. (A) La coloration de la gaine de myéline au bleu de Luxol montre une perte importante de la myéline au niveau des tractus cortico-spinaux (têtes de flèche). (B) Les colorations à l'hématoxyline et à l'éosine mettent en évidence une perte de neurones de grande taille dans les cornes ventrales (flèches). (C) L'immunomarquage de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), marquant les astrocytes, montre une importante astrocytose dans les cornes ventrales (flèches) (d'après Deng *et al.*, 2011).

D'un point de vue histopathologique, la SLA liée à l'*UBQLN2* se caractérise principalement par la présence **d'agrégats protéiques, ou inclusions**, qui sont majoritairement localisés dans les MNs de la moelle épinière. Ces inclusions, absentes chez les individus sains, ont une morphologie typique ressemblant à des filaments d'où le terme d'inclusion en écheveau (ou « skein-like » inclusion) (Deng *et al.*, 2011).

Des analyses immunohistochimiques *post mortem* ont confirmé la présence d'inclusions « skein-like » cytoplasmiques positives pour l'ubiquiline 2 dans **les MNs spinaux** de patients atteints de SLA liée à l'*UBQLN2* portant les mutations P497H ou P506T (**figure 16**) (Deng *et al.*, 2011). Dans ces inclusions localisées dans la moelle épinière, l'ubiquiline 2 co-localise avec d'autres protéines telles que l'**ubiquitine, p62, TDP-43, FUS et l'optineurine mais pas avec SOD1**. Ces observations indiquent que la voie de dégradation des protéines dans les cellules exprimant l'ubiquiline 2 mutée est détériorée (Deng *et al.*, 2011).

De plus, **tous les cas sporadiques et familiaux de SLA, accompagnée ou non de démences**, qui ont été étudiés par Deng et ses collaborateurs, présentent aussi des inclusions « skein-like » positives à l'ubiquiline 2 dans les neurones localisés dans les cornes ventrales de la moelle épinière. L'ubiquiline 2 pourrait donc jouer un rôle important dans la formation de ces inclusions pour les différentes formes de SLA. Les protéines TDP-43 et ubiquitine ont également été retrouvées dans les inclusions d'ubiquiline 2 dans la moelle épinière de patients atteints de SLA, SLAs ou de SLAs/démence (Deng *et al.*, 2011).

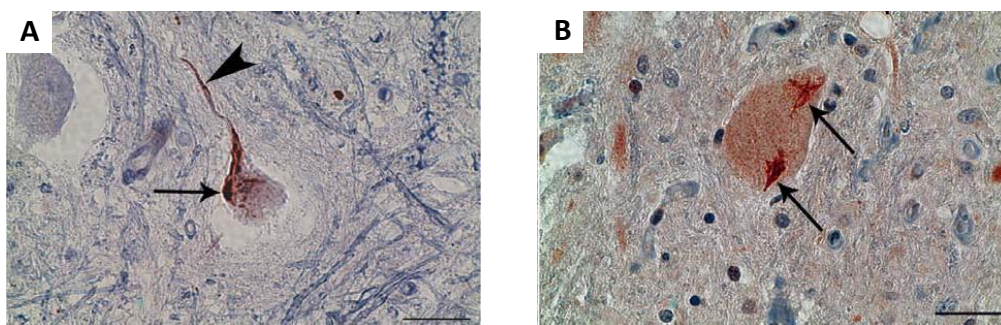


Figure 16: Photos représentatives de la formation d'inclusions "skein-like" localisées dans les neurones de moelle épinière chez un patient atteint de SLA liée à l'ubiquiline 2^{P506T}.

Les analyses immunohistochimiques ont été réalisées à l'aide de deux anticorps; **(A)** l'un reconnaît la région C-terminale de l'ubiquiline 2 (acides aminés 554 à 624) et **(B)** l'autre reconnaît la région N-terminale de l'ubiquiline 2 (acides aminés 8 à 24). Les inclusions « skein-like » localisées dans le cytoplasme des neurones (flèches) et dans les neurites (tête de flèche) sont positives pour l'ubiquiline 2. Barre d'échelle : 100µm (d'après Deng *et al.*, 2011).

Ces inclusions positives pour l'ubiquiline 2 ont également été retrouvées dans les neurites et le cytoplasme de neurones localisés dans différentes régions **de l'hippocampe** (couche moléculaire du gyrus denté, CA1 et CA3) dans des cas de SLA uniquement accompagnée de démences, avec ou sans mutation de l'ubiquiline 2 (**figure 17**). Ces observations suggèrent que les signes de démence sont liés à la formation d'inclusions d'ubiquiline 2 dans l'hippocampe, en présence ou en absence de mutation dans le gène *UBQLN2*. En effet, chez les patients atteints de SLA-DFT portant des mutations dans le gène *UBQLN2*, les inclusions d'ubiquiline 2 co-localisent avec l'ubiquitine. Les individus n'exprimant pas l'ubiquiline 2 mutée montrent une co-localisation de l'ubiquiline 2 avec l'ubiquitine et p62 dans les inclusions.

D'autre part, la protéine TDP-43 a été identifiée dans les inclusions cytoplasmiques positives pour l'ubiquitine et p62, uniquement dans quelques cellules de la couche moléculaire du gyrus denté. Quant à la protéine FUS, également impliquée dans des cas de SLA-DFT, elle n'a été détectée dans aucune inclusion ([Deng et al., 2011](#)).

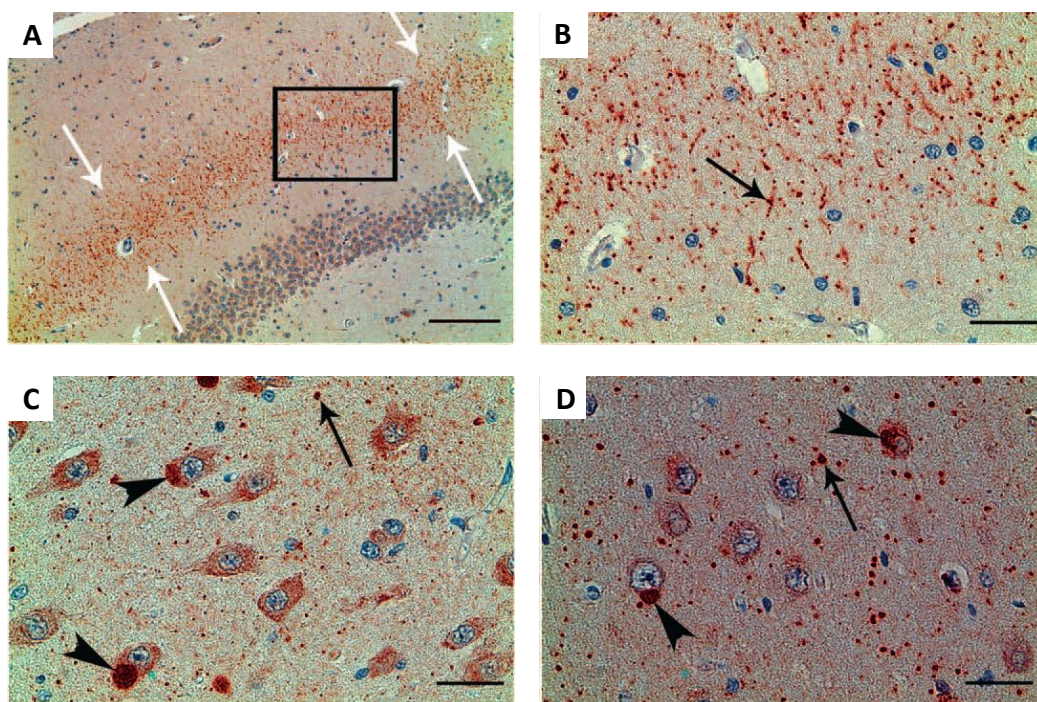


Figure 17: Photos représentatives des inclusions positives pour l'ubiquiline 2 observées dans l'hippocampe d'un patient atteint de SLA liée à l'ubiquiline 2^{P506T}.

Les analyses d'immunohistochimie montrent la présence d'inclusions positives pour l'ubiquiline 2 majoritairement localisées dans la région intermédiaire de la couche moléculaire du gyrus denté (**A et B**), CA3 (**C**) et CA1 (**D**). La figure **B** est un agrandissement de la région encadrée en figure **A**. Les flèches noires indiquent la présence d'inclusions dans les neurites (**B, C et D**) et les têtes de flèche noire indiquent la présence d'inclusions cytoplasmiques dans les cellules (**C et D**). Barres d'échelle : (**A**) 200µm, (**B**) 50µm, (**C et D**) 25µm (d'après [Deng et al., 2011](#)).

Ces résultats, montrant l'accumulation évidente de protéines, suggèrent donc qu'un dysfonctionnement du renouvellement des protéines pourrait être responsable de la plupart des cas de SLA et pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Cependant, le développement de modèles appropriés de la SLA liée à l'UBQLN2 est une condition préalable à la caractérisation des conséquences phénotypiques de ces mutations et à l'élaboration de stratégies thérapeutiques adéquates.

2.3.3 Les modèles animaux de la SLA liée aux mutations de l'UBQLN2

La découverte de cette nouvelle forme familiale de SLA a suscité beaucoup d'intérêt de la part des chercheurs travaillant sur la SLA, en raison du rôle majeur que pourrait jouer l'ubiquiline 2 dans le dysfonctionnement de la voie de dégradation des protéines et dans la formation des agrégats protéiques toxiques pour les MNs. Afin de mieux comprendre l'implication de cette protéine dans la pathogénèse de la SLA liée à l'UBQLN2, plusieurs modèles animaux exprimant l'ubiquiline 2 mutée ont été générés et décrits dans la littérature scientifique ces dernières années.

Souris transgéniques exprimant l'ubiquiline 2^{P497H} (Gorrie et al., 2014)

Le premier modèle de souris transgénique exprimant l'ubiquiline 2^{P497H} a été généré par microinjection d'œufs fécondés (croisement de souris C57BL/6 x SJL) avec un transgène contenant la séquence d'ADN génomique de l'ubiquiline 2 humaine mutée (c.1490C>A soit p.P497H), dont l'expression est contrôlée par le promoteur de l'ubiquiline 2 humaine. La lignée portant le plus grand nombre de copies du transgène a été sélectionnée. Du fait de l'intégration du transgène dans le chromosome Y, cette lignée a été composée uniquement de souris mâles. Les niveaux d'expression entre l'ubiquiline 2 humaine et l'ubiquiline 2 murine endogène se sont avérés similaires ; plus élevés dans le cerveau et la moelle épinière que dans le foie.

Les souris transgéniques âgées de 11 mois ont présenté des **agrégats** positifs pour les protéines ubiquiline 2 et p62, principalement localisés dans les cornes dorsales (lamina II) de la **moelle épinière**. Toutefois, les inclusions « skein-like » caractéristiques de la SLA, n'ont pas été retrouvés dans les MNs situés dans les cornes ventrales de la moelle épinière. Les agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 ont aussi été observés au niveau de l'**hippocampe** (gyrus denté et CA) avec une augmentation de leur taille et de leur nombre avec l'âge (observés à 2, 3 et 15 mois). A 15 mois, la quantité d'agrégats est devenue importante dans les dendrites de la région du néocortex et du cervelet. Les agrégats d'ubiquiline 2, observés dans la région de l'hippocampe, ont également été positifs pour les protéines ubiquitine, p62 et OPTN, mais pas pour les protéines FUS et TDP-43.

Une spinopathie dendritique a pu être observée dans les régions de l'hippocampe et du cortex cérébral des souris exprimant l'ubiquiline 2^{P497H}, se caractérisant par la présence

d'inclusions protéiques dans les épines dendritiques (pathologie apparemment jamais rapportée pour les maladies neurodégénératives). Le diamètre des épines dendritiques, des neurones localisés dans la couche moléculaire du gyrus denté, a été 4 à 5 fois supérieur à la normale et leur densité a été significativement réduite chez les souris transgéniques par rapport aux souris contrôles à l'âge de 15 mois. De plus, un dysfonctionnement synaptique touchant la transmission du signal au niveau des dendrites (postsynaptique) a été détecté. Toutefois, **aucune neurodégénérescence** n'a été constatée au niveau de la couche de cellules granulaires du gyrus denté chez les souris transgéniques.

Des souris double-transgéniques exprimant l'ubiquiline 2^{P497H} et la GFP-ub^{G76V} (servant de substrat protéique ubiquitinylé) ont montré une accumulation de la GFP ubiquitinylée dans l'hippocampe qui n'a pas été observée chez les souris simple-transgéniques exprimant uniquement la GFP-ub^{G76V}. De plus, les agrégats d'ubiquiline 2 ont également été positifs pour des protéines du protéasome et de la GFP ubiquitinylée. L'accumulation de la GFP ubiquitinylée témoigne donc d'un **dysfonctionnement du système SUP**, hors les fonctions postsynaptiques sont régulées par le « turnover » des protéines synaptiques qui est assuré par le système SUP. Ainsi, le dysfonctionnement de ce système dans les épines dendritiques pourrait conduire à un dysfonctionnement synaptique.

D'un point de vue phénotypique, les souris transgéniques ont montré des **déficiences cognitives** à l'âge de 11 mois. Lors du test du labyrinthe en Y, les souris transgéniques ont moins souvent alterné leur exploration d'un bras à l'autre du Y (52%) par rapport aux souris non transgéniques (78%). Les souris exprimant l'ubiquiline 2^{P497H} ont donc eu une activité exploratoire moins développée que les souris contrôles. Néanmoins, le nombre d'entrées dans un bras du Y a significativement été plus élevé chez les souris transgéniques que chez les souris contrôles, indiquant une **absence de déficience motrice** chez les souris transgéniques (>600j). L'absence d'inclusion « skein-like » dans les MNs spinaux pourrait expliquer l'absence de phénotype moteur. Une déficience de la mémoire temporelle a également pu être constatée par le test de conditionnement à la peur, où le comportement de peur a été nettement moins important chez les souris transgéniques par rapport aux souris contrôles (aussi bien quand les souris ont été placées dans la même chambre que dans une nouvelle chambre). Une déficience de la mémoire spatiale a aussi été observée chez les souris transgéniques lors du test de la piscine de Morris. En effet, le temps et la distance parcourue par ces souris, pour atteindre la plateforme placée au centre de la piscine, n'ont pas été significativement différents de ceux mesurés pour les souris non transgéniques. Quand la plateforme a été retirée, en revanche, les souris transgéniques ont mis plus de temps et ont parcouru une distance plus longue par rapport aux souris contrôles.

Ce modèle murin transgénique exprimant l'ubiquiline 2^{P497H} présente certaines caractéristiques de la SLA-UBQLN2 comme la formation d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 dans moelle épinière (à 11 mois) et dans le cerveau (à partir de 2 mois), une spinopathie dendritique, ainsi que des déficiences cognitives (à 11 mois). Cependant, aucune neurodégénérescence ni trouble moteur, qui font partie des principales caractéristiques de la pathologie, n'a été observé.

Rats transgéniques exprimant l'ubiquiline 2^{P497H} (Wu et al., 2015)

Un deuxième modèle transgénique pour la SLA-UBQLN2 a été créé chez le rat. Il s'agit d'un modèle double-transgénique portant un premier transgène renfermant le gène de la tétracycline (tTA) sous le contrôle du promoteur murin Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II alpha (CaMkα2), et un deuxième transgène (20 copies insérées dans le génome) renfermant le gène humain de l'ubiquiline 2 humaine (mutation P497H) précédé par le promoteur Tetracycline-Response Element (TRE), permettant l'expression de l'ubiquiline 2 uniquement dans les neurones du cerveau (**figure 18**). Ces animaux ont été traités avec de la Doxycycline durant le développement embryonnaire afin d'éviter toute mort prématurée (au stade embryonnaire) qui pourrait éventuellement être induite par l'expression de l'ubiquiline 2 mutée. Des rats simple-transgéniques portant le transgène avec la séquence codant pour la tTA ont été utilisés comme contrôle exprimant uniquement l'ubiquiline 2 endogène.

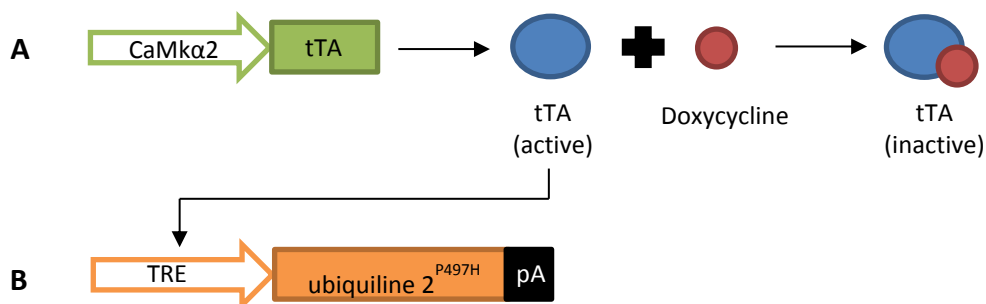


Figure 18: Représentation schématisée du contrôle de l'expression du gène codant pour l'ubiquiline 2 mutée. (A) Le transgène portant la séquence du gène qui code pour la tétracycline avec, en aval, le promoteur murin CaMkα2. Lors du traitement des souris avec la Doxycycline, cette dernière se fixe à la tétracycline qui devient alors inactive. En absence de traitement à la Doxycycline, la tTA va activer le promoteur TRE (B) permettant ainsi l'expression du gène de l'ubiquiline 2 mutée (système Tet-Off).

Chez ce modèle, des analyses par western blot sur des échantillons de cortex ont montré la présence des formes humaine et endogène de l'ubiquiline 2 dans la fraction soluble mais également dans la fraction insoluble, alors que chez les rats contrôles, l'ubiquiline 2 endogène n'a été détectée que dans la fraction soluble. Ceci suggère que l'ubiquiline 2 mutée a formé des agrégats insolubles et pouvant piéger la forme endogène au sein des inclusions. Ensuite, les

analyses d'immunofluorescence sur l'ubiquiline 2 (humaine et de rat) ont montré une accumulation **d'inclusions** se formant d'abord dans le cytoplasme puis dans le noyau des cellules du **gyrus denté et du cortex** chez les rats exprimant l'ubiquiline 2 mutée (étude réalisée entre 20 et 130 jours). Les protéines TDP-43 et FUS, responsables de certaines formes familiales de SLA et de DFT, n'ont pas été retrouvées au sein des inclusions.

Une réduction significative de la densité des neurones dans le gyrus denté et le cortex a été observée chez les rats exprimant la protéine mutée (par rapport aux rats contrôles) mais seulement à un âge avancé (130 jours) ; ce qui suggère que la formation des agrégats précéderait la **dégénérescence des neurones**. Ces rats exprimant l'ubiquiline 2 mutée ont présenté une structure corticale déformée avec des neurones privés de neurites. En réponse à la neurodégénérescence, **une prolifération des cellules astrocytaires (ou astrogliose) et microgliales** (ou microgliose) a également été observée à 130 jours (d'après des analyses d'immunofluorescence).

En raison du rôle des ubiquilines dans l'autophagie, l'effet de l'expression de l'ubiquiline 2 mutée sur cette voie de dégradation a été étudié par des analyses d'immunofluorescence (à 20 et 130 jours) qui ont montré une accumulation progressive des protéines clés de l'autophagie : p62 et LC3-II. **L'ubiquiline 2 mutée perturbe donc le fonctionnement de la voie autophagique**. De plus, l'ubiquiline 2 mutée a conduit à la réduction de la quantité de protéine EEA1 (early endosome antigen 1), qui est un marqueur des endosomes précoces (80 jours), montrant ainsi **son interférence avec la voie endosomale**.

D'un point de vue phénotypique, les rats exprimant l'ubiquiline 2 mutée ont présenté une déficience de l'apprentissage spatial comparés aux rats contrôles, à 130 jours lors du test du labyrinthe de Barnes. Comme observé dans le modèle généré par [Gorrie et al. \(2014\)](#), l'expression de l'ubiquiline 2^{P497H} a causé des **déficits cognitifs**.

Ce modèle de rat transgénique exprimant l'ubiquiline 2^{P497H} présente certaines caractéristiques de la SLA-UBQLN2. En effet, les analyses histologiques dans le cerveau ont révélé une accumulation d'inclusions positives pour l'ubiquiline 2 dans le cerveau (entre 20 et 130 jours), une astrogliose, une microgliose ainsi qu'une neurodégénérescence seulement à un stade avancé dans la maladie (à 130 jours). Des analyses phénotypiques ont mis en évidence des déficits cognitifs. Toutefois, aucune analyse sur la moelle épinière ou sur le muscle n'a été réalisée, et aucun trouble moteur n'a été décrit dans ce modèle.

Souris transgéniques knock-in exprimant l'ubiquiline 2^{P520T} (Hjerpe et al., 2016)

Un modèle de souris knock-in a été créé par transgénèse classique. Ces souris expriment l'ubiquiline 2^{P520T} murine (mutation équivalente à la mutation P506T identifiée chez l'Homme) dont l'expression du gène est contrôlée par le promoteur endogène murin.

Les déficits cognitifs ont été accompagnés **d'inclusions positives pour les protéines ubiquiline 2 et p62 au niveau de l'hippocampe, du cortex et du tronc cérébral** des souris knock-in (d'après des analyses d'immunohistochimie réalisées entre 15 et 18 mois). L'ubiquiline 2 a été détectée dans la fraction insoluble uniquement dans l'hippocampe et non dans le cortex ni le cervelet (d'après des analyses par western blot effectuées entre 15 et 18 mois).

Comme précédemment démontré *in vitro*, l'expression de l'ubiquiline 2^{P520T} dans le cerveau des souris knock-in conduit à une baisse d'interaction de l'ubiquiline 2 avec la protéine HSP70 comparées aux souris sauvages.

Des déficiences cognitives ont été observées chez les souris knock-in durant des tests de reconnaissance d'objet ; elles passent moins de temps que les souris sauvages pour distinguer un nouvel objet d'un objet familier à l'âge de 12 mois, de même qu'elles étaient incapables de distinguer un objet dans un nouvel environnement à 9 et 12 mois.

Aucune déficience motrice, en revanche, n'a été observée chez ce modèle lors des analyses de la marche et au rotarod, excepté une légère foulée de longueur plus courte par rapport aux souris sauvages.

Souris transgéniques exprimant l'ubiquiline 2^{P497S} ou l'ubiquiline 2^{P506T} (Le et al., 2016)

Dernièrement, deux modèles de souris transgéniques ont été générés par injection de vecteurs d'expression, portant la séquence d'ADNc de l'ubiquiline 2 humaine mutée (mutations P497S ou P506T responsables de SLA-DFT chez l'Homme), d'œufs fertiles hybrides (B6C3/C57BL/6J). Selon le même procédé, des souris transgéniques exprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ont été générées. Les lignées produites portent entre 1 à 5 copies pour chaque construction.

A 8 mois, les niveaux d'ubiquiline 2^{P497S} et d'ubiquiline 2^{P506T} ont été significativement supérieurs à celui de l'ubiquiline 2 humaine sauvage, dans la moelle épinière. De même que le niveau de l'ubiquiline 2 endogène a été augmenté chez les souris exprimant la protéine mutée par rapport à celles exprimant la protéine sauvage et les souris non transgéniques (d'après des analyses de western blot).

De nombreuses **inclusions positives pour l'ubiquiline 2** ont été observées **dans le cerveau** (cortex, hippocampe, striatum et tronc cérébral) et **la moelle épinière** de souris surexprimant l'ubiquiline 2^{P497S} ou P506T, et leur nombre a augmenté au cours du temps (d'après des analyses d'immunohistochimie réalisées à 1, 8 et 12 mois). En revanche, les inclusions ont été rares chez les souris exprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage et les souris non transgéniques où le marquage de la protéine a été plus uniforme. Comme observé dans les modèles générés par [Ceballos-Diaz et al. \(2015\)](#), **l'ubiquiline 2 a co-localisé avec l'ubiquitine et la thioflavine S au sein des inclusions observées dans le cerveau** des souris exprimant l'ubiquiline 2^{P497S} ou P506T.

Une neurodégénérescence a également été observée au niveau **des cornes ventrales de la moelle épinière** et **dans le cerveau (cortex moteur, gyrus denté et CA1)** des souris exprimant l'ubiquiline 2 mutée, dès le début de la maladie (à 3 mois) et qui s'est accentuée dans la moelle épinière jusqu'à la fin de la maladie (à 8 mois). Dans la moelle épinière de ces deux modèles, **une prolifération des cellules astrocytaires et microgliales** a aussi été mise en évidence à l'âge de 8 mois par des analyses de western blot.

La **pathologie TDP-43** a été observée dans les MNs spinaux des souris surexprimant l'ubiquiline 2 mutée qu'à un stade avancé dans la maladie (8 mois). La protéine TDP-43 n'a pas été détectée dans le noyau des MNs, mais au sein d'inclusions cytoplasmiques positives pour l'ubiquiline 2 et l'ubiquitine. Néanmoins, la pathologie de TDP-43 n'a pas été retrouvée dans l'hippocampe.

La médiane de survie a été réduite à 246j et 305j pour les souris exprimant l'ubiquiline 2^{P506T} et l'ubiquiline 2^{P497S} respectivement, alors que les deux lignées de souris exprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ont une médiane de survie similaire à celle des souris non transgéniques. Les souris exprimant l'ubiquiline 2^{P497S} ou l'ubiquiline 2^{P506T} ont également eu **un poids significativement inférieur** (à partir de 26 et 18 semaines, respectivement) à celui des souris non transgéniques.

Contrairement aux modèles décrits précédemment, un phénotype musculaire sévère a été observé chez ces souris en fin de vie. En effet, une réduction de la masse musculaire et du diamètre des myofibrilles (muscle *gastrocnemius*) a été mise en évidence chez les souris exprimant l'ubiquiline 2^{P497S} ou l'ubiquiline 2^{P506T}, par rapport aux souris non transgéniques. Seule, une légère baisse de la masse musculaire des souris exprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage a été observée. De plus, les performances musculaires et la force d'agrippement des souris exprimant l'ubiquiline 2^{P506T} ont été significativement diminuées à partir de 6 semaines par rapport aux souris non transgéniques. Chez les souris exprimant l'ubiquiline 2^{P506T}, en revanche, ces phénotypes

musculaires sont apparus plus tardivement (vers 24 semaines). La surexpression de l'ubiquiline 2 mutée, mais pas de l'ubiquiline 2 sauvage, conduit donc à une **atrophie** et **une faiblesse musculaire**.

La pathologie musculaire a été accompagnée de **déficiences motrices** se manifestant par des difficultés pour se déplacer pouvant évoluer en une paralysie des pattes arrière vers l'âge de 7 mois (paralysie observée chez environ 40% des souris portant la mutation P497S et 10% des souris portant la mutation P506T). De plus, un phénotype de « clasping » a été observé au niveau des pattes avant et arrière des souris l'ubiquiline 2^{P497S} ou P506T. Aucun de ces phénotypes n'a été observé chez les souris non transgéniques ou exprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage.

La surexpression de l'ubiquiline 2^{P506T} et de l'ubiquiline 2^{P497S} conduit à des **déficiences cognitives** dont des troubles de la mémoire observés lors du NOR-test, pendant lequel les souris n'ont pas fait la distinction entre un nouvel objet et un objet familier (étude réalisée à 2-3 mois).

Ces modèles murins transgéniques exprimant l'ubiquiline 2^{P497S} ou l'ubiquiline 2^{P506T} humaines récapitulent les principales caractéristiques de la SLA-UBQLN2. En effet, les analyses histologiques ont mis en évidence la présence d'inclusions positives pour l'ubiquiline 2 dans le cerveau (cortex, hippocampe, striatum et tronc cérébral) et la moelle épinière qui s'accumulent au cours du temps (entre 1 à 12 mois). Une neurodégénérescence dans les cornes ventrales de la moelle épinière et dans le cerveau (dès 3 mois), une astrogliose et une microgliose (à 8 mois) ainsi que la protéinopathie TDP-43 dans les MNs spinaux ont également été observés. L'expression transgénique de l'ubiquiline 2^{P497S} ou de l'ubiquiline 2^{P506T} chez les souris conduit à une réduction de leur poids (à partir de 26 et 18 semaines, respectivement) et de leur survie (246j et 305j, respectivement) ainsi qu'à des déficiences motrices (à 7 mois) et cognitives (2-3 mois). En fin de vie, les souris présentent une atrophie musculaire (à partir de 3 mois) accompagnée d'une faiblesse musculaire (à partir de 6 mois pour les souris exprimant l'ubiquiline 2^{P506T} et 24 semaines pour celles exprimant l'ubiquiline 2^{P497S}).

*Les modèles animaux décrits jusqu'à présent dans la littérature ne récapitulent pas l'ensemble des caractéristiques histologiques, cognitives et motrices de la maladie humaine, à l'exception du modèle transgénique généré dernièrement par [Le et ses collaborateurs \(2016\)](#) (**tableau 3**).*

Tableau 3: Modèles de SLA liée à l'UBQLN2 avec leurs caractéristiques physiopathologiques.

Caractéristiques physiopathologiques de la SLA-UBQLN2	Souris Tg Ub2 ^{P497H} (Gorrie et al., 2014)	Rats Tg Ub2 ^{P497H} (Wu et al., 2015)	Souris Tg knock-in Ub2 ^{P520T} (Hjerpe et al., 2016)	Souris Tg Ub2 ^{P497S} ou Ub2 ^{P506T} (Le et al., 2016)
Protéinopathie	- Moelle épinière : agrégats Ub2 (+) et p62(+) dans cornes dorsales mais pas dans MNs - Hippocampe : agrégats Ub2 (+), Ubq (+), p62 (+), OPTN (+) mais FUS (-) et TDP-43 (-)	- Moelle épinière : non renseigné - Hippocampe et cortex : Ub2 (+) mais TDP-43 (-), FUS (-)	- Moelle épinière : non renseigné - Hippocampe et cortex : inclusions Ub2 (+), p62 (+)	- Moelle épinière : Ub2 (+), Ubq (+), TDP-43 (+) - Hippocampe et cortex (entre autres) : inclusions Ub2 (+), Ubq (+)
Neurodégénérescence	- Moelle épinière : non renseigné - Hippocampe : absente	- Moelle épinière : non renseigné - Hippocampe et cortex : présente	Non renseigné	- Moelle épinière : présente - Hippocampe et cortex : présente
Neuroinflammation	Non renseigné	- Moelle épinière : non renseigné - Cerveau : astrogliose et microgliose	Non renseigné	- Moelle épinière : astrogliose et microgliose - Cerveau : non renseigné
Amyotrophie	Non renseigné	Non renseigné	Non renseigné	- Réduction de la masse musculaire - Réduction du diamètre des fibres
Faiblesse musculaire	Non renseigné	Non renseigné	Non renseigné	- Réduction de la force d'agrippement
Déficiência motrice	Absente	Absente	Absente	- Difficultés à se déplacer - Paralysie des pattes arrière
Déficiences cognitives	- De la mémoire spatiale - De la mémoire temporelle - De l'activité exploratoire	- De la mémoire spatiale	- De la mémoire	- De la mémoire
Démences	Non renseigné	Non renseigné	Non renseigné	Non renseigné
Age d'apparition des caractéristiques physiopathologiques	- Agrégation : 2 mois - Phénotype : 11 mois	- Agrégation : 20 jours - Phénotype : 130 jours	- Agrégation : 15 mois - Phénotype : 9 mois	- Agrégation : 1 mois - Phénotype musculaire : 24 semaines (P497S) et 6 semaines (P506T) - Phénotype moteur : 7 mois - Phénotype cognitif : 2-3 mois

Tg : transgénique ; **Ub2** : ubiquiline 2 ; **Ubq** : ubiquitine ; **Non renseigné** : caractéristique non évoquée dans la publication scientifique ; **Absente** : caractéristique recherchée mais non observée dans le(s) modèle(s) en question.

3 Traitements et thérapie génique pour la SLA

Malgré l'avancée dans l'identification des gènes associés à la maladie et dans la compréhension des mécanismes pathologiques de la SLA, il n'existe actuellement aucun traitement efficace. Ces dernières décennies, les soins aux patients se sont concentrés exclusivement sur les traitements symptomatiques et sur une amélioration physique. Le Riluzole, un agent anti-glutamatergique bloquant la libération pré-synaptique du glutamate, a été le premier médicament approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement de la SLA. Cependant, son efficacité est discutable, avec des avantages thérapeutiques minimaux d'environ 3 à 4 mois d'augmentation de la survie (Ludolph et Ludolph, 2009 ; Glicksman, 2011 ; Contestabile, 2011 ; Nagoshi et al., 2015).

Bien qu'il reste une avancée majeure à faire vers l'identification de nouveaux facteurs génétiques impliqués dans la SLA, il est urgent de convertir l'information génétique déjà disponible en thérapie efficace pour cette pathologie. L'étiologie de la SLA, comme d'autres maladies neurodégénératives, est hautement multifactorielle, associée à une excitotoxicité induite par le glutamate, un stress oxydatif, une inflammation, une perte de facteurs neurotrophiques, des repliements et agrégations protéiques, un contrôle de la qualité des protéines déficient et un dysfonctionnement mitochondrial (Dunkel et al., 2012). Malgré de multiples études précliniques et essais cliniques, le mécanisme exact de la pathogénèse et de la progression de la SLA reste inconnu. Ainsi, le développement d'une thérapie ciblée et efficace est l'un des enjeux majeurs auxquels les scientifiques sont confrontés aujourd'hui (De Loach et al., 2015). Voici un aperçu des différentes stratégies thérapeutiques pour traiter cette maladie neurodégénérative multifactorielle.

3.1 Stratégies pharmacologiques pour la SLA

3.1.1 Stratégies ciblant l'excitotoxicité

Le principal neurotransmetteur exciteur du SNC est le glutamate. Une activation excessive de ses récepteurs et une défaillance dans son élimination de la fente synaptique ou une sensibilité post-synaptique accrue entraîne l'accumulation de médiateurs excitateurs causant des lésions neuronales. Une telle neurotoxicité due à des médiateurs excitateurs, s'appelle l'excitotoxicité. Cette activation induit un afflux important d'ions calcium qui endommagent la cellule par activation de protéases, de lipases et de nucléases. L'excitotoxicité semble être également responsable d'autres caractéristiques de la SLA, telles que la perturbation du calcium, l'activation d'enzymes protéolytiques, des dysfonctionnements mitochondriaux et un déséquilibre énergétique (Guo et al., 2003 ; Kawahara et Kwak, 2005 ; Matyja et al., 2006 ; Zhao et al., 2008).

D'autre part, la mutation de la SOD1 peut entraîner des perturbations dans l'homéostasie du calcium. En effet, les agrégats de SOD1 liés à la mutation A4V forment des pores qui s'intègrent à la membrane, entraînant un afflux de calcium. Ceci suggère que la SOD1 mutée peut contribuer au dommage excitotoxique sans la contribution d'autre élément lié à la glutamatérgie (Allen et al., 2012).

Le Riluzole inhibe la libération de glutamate et inhibe de manière non-compétitive les récepteurs post-synaptiques NMDA et AMPA, ainsi que l'activation d'un processus de transduction du signal dépendant de la protéine G. Ainsi, le Riluzole ralentit la progression de la maladie chez les souris transgéniques SOD1^{G93A} et augmente la survie des patients de quelques mois (Contestabile et al., 2011). Une grande variabilité de son efficacité a conduit au développement de dérivés plus stables. En effet, une vingtaine de pro-médicaments du Riluzole a été identifiée et évaluée pour leur utilisation probable dans le traitement de la toxicité du glutamate dans la SLA.

Plusieurs études ont suggéré que l'élimination du glutamate des synapses neuromusculaires est perturbée chez les patients atteints de SLA en raison de la perte de l'EAAT2 (Transporteur d'acide aminé excitatoire, également connu sous le nom de transporteur de glutamate, GLT1) (Rothstein et al., 1995). De façon intéressante, il a été démontré que le niveau de GLT1 est augmenté en présence d'antibiotiques bêta-lactames, tels que la pénicilline et ses dérivés. Le Ceftriaxon, un antibiotique bêta-lactame de troisième génération, réduit l'excitotoxicité du glutamate en augmentant l'activité du promoteur de GLT1. L'augmentation de l'expression et de la fonction de GLT1 a été observée chez des souris SOD1^{G93A} traitées avec du Ceftriaxon au début des symptômes (Rothstein et al., 2005). Cependant, dans une étude réalisée sur une centaine de patients atteints de SLA, le Ceftriaxon n'a pas amélioré la force musculaire ni les scores d'incapacité (Beghi et al., 2006).

3.1.2 Stratégies thérapeutiques ciblant le stress oxydatif

Des lésions oxydatives ont été observées dans les modèles cellulaires et murins de la maladie, dans les MNs de la moelle épinière et du cortex moteur, et dans le liquide céphalorachidien de patients atteints de SLA (Shaw et al., 1995 ; Ferrante et al., 1997 ; Abe et al., 1995 ; Abe et al., 1997). Plusieurs agents neuroprotecteurs ayant des capacités antioxydantes ont été étudiés en relation avec la SLA. Par exemple, le Rasagiline, un inhibiteur de la monoamine oxydase utilisé pour traiter la maladie de Parkinson (Olfield et al., 2007), présente des propriétés neuroprotectives en régulant la transition de perméabilité de la mitochondrie et en augmentant sa survie. Le Rasagiline, seule ou en combinaison avec le Riluzole, améliore à la fois les performances motrices et la survie des souris SOD1^{G93A} (Waibel et al., 2004). D'autre part,

l'Edaravone (ou Radicava), un antioxydant permettant l'élimination de radicaux libres, a un effet neuroprotecteur. Il retarde la progression de la maladie, la dégénérescence des MNs et la perte de poids, et permet également une réduction du nombre d'agrégats de SOD1 chez les souris SOD1^{G93A} (Ito et al., 2008). Son efficacité comme traitement de la SLA a été démontrée dans un essai clinique de six mois mené au Japon. Lors de cet essai, 137 participants ont été répartis aléatoirement pour recevoir soit l'Edaravone, soit un placebo. À la 24^{ème} semaine, les patients ayant reçu l'Edaravone ont montré un ralentissement dans la progression de la maladie par rapport à ceux ayant reçu le placebo. En juin 2017, le médicament Radicava développé par de Mitsubishi Tanabe Pharma a été approuvé par la FDA.

3.1.3 Stratégies thérapeutiques ciblant la neuroinflammation

La neuroinflammation est une manifestation pathologique commune des maladies neurodégénératives et représente donc une cible thérapeutique potentielle importante (Yong et Rivest, 2009). Dans la SLA, les dommages aux MNs conduisent à l'activation de la microglie, des astrocytes et du système du complément conduisant à la neurodégénérescence (Troost et al., 1990 ; Zhao et al., 2013). L'analyse du liquide céphalorachidien et de la moelle épinière provenant de patients atteints de SLA a montré une augmentation de l'activation microgliale et de la diffusion des lymphocytes T (Henkel et al., 2004; Sta et al., 2011), ainsi qu'une concentration plus élevée de médiateurs inflammatoires (Kuhle et al., 2009). L'activation et la prolifération microgliales sont également illustrées dans les modèles animaux de la SLA (Henkel et al., 2009). Les astrocytes jouent un rôle clé dans la neuroinflammation en produisant plusieurs médiateurs inflammatoires, comme la prostaglandine E2, le leucotriène B4 et l'oxyde nitrique (Hensley et al., 2006). En outre, les astrocytes des patients atteints de SLA sont toxiques pour les MNs et cette toxicité est en partie engendrée par la surexpression de gènes inflammatoires (Haidet-Phillips et al., 2011). Un certain nombre d'agents neuroprotecteurs ciblant les voies inflammatoires de la SLA ont été développés. Par exemple, le Tocilizumab est un agent anti-inflammatoire pour la polyarthrite rhumatoïde qui réduit la neuroinflammation. Plus précisément, il s'agit d'un anticorps anti-interleukine 6 (IL-6) qui réduit l'activation des macrophages, des monocytes et des lymphocytes T, diminuant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires. Le blocage de la signalisation du récepteur IL-6 par le Tocilizumab réduit ainsi la progression de la SLA.

3.1.4 Stratégies thérapeutiques ciblant la dégradation des protéines

La présence d'agrégats protéiques est l'une des caractéristiques pathologiques importantes de la SLA. Les voies de dégradation des protéines, le SUP et l'autophagie jouent un rôle crucial dans l'élimination des protéines mal repliées et dans la prévention de l'agrégation protéique (Bennett et al., 2005). Plusieurs composés chimiques ont été capables de réduire les agrégats dans

des modèles animaux de SLA. Par exemple, l'Arimoclomol faisant partie de la famille des «drogues intelligentes» permet l'expression de certaines protéines (heat shock protein) uniquement sous des conditions de stress cellulaire. Le traitement post-symptomatique par Arimoclomol, a permis de ralentir la progression de la maladie et d'obtenir une survie accrue chez les souris SOD1^{G93A} (Phukan, 2010 ; Kieran et al., 2004). De plus, le traitement administré en phase tardive, a amélioré la fonction musculaire. Il a également été démontré que l'Arimoclomol réduit les agrégats d'ubiquitine dans la moelle épinière de souris SOD1^{G93A} (Kalmar et al., 2008). Des essais cliniques en phase II / III sont en cours et ont montré une bonne tolérance du traitement (Cudkowicz et al., 2008 ; Lanka et al., 2009).

3.1.5 Stratégies thérapeutiques visant les dysfonctionnements mitochondriaux

La mitochondrie est une organelle intracellulaire impliquée dans la production d'ATP, l'homéostasie du calcium et la régulation intrinsèque de l'apoptose. Un grand nombre d'études ont mis en évidence le rôle important des mitochondries dans la pathogénèse des maladies neurodégénératives (Di Carlo et al., 2012; Keating, 2008 ; Lin et Beal, 2006). Il a été rapporté que la teneur en ADN mitochondrial et l'activité des complexes des chaînes respiratoires sont diminuées dans la moelle épinière des patients atteints de SLA (Wiedemann et al., 2002). La dysfonction des mitochondries a également été rapportée dans les muscles squelettiques de patients atteints de SLA (Wiedemann et al., 1998). Des études *in vitro* ont montré des changements morphologiques et fonctionnels des mitochondries dans les cellules NSC-34 exprimant le SOD1 mutée (Menziez et al., 2002). Il a été observé que la capacité tampon du calcium des mitochondries est affectée dans le cerveau et la moelle épinière des souris SOD1^{G93A} (Damiano et al., 2006). Les perturbations de l'activité tampon du calcium dans les MNs les rendent vulnérables à l'excitotoxicité engendrée par le glutamate. De plus, les mitochondries sont la principale composante cellulaire contrôlant l'apoptose. Il a été démontré que les agrégats de SOD1 mutée se lient avec des éléments anti-apoptotiques mitochondriaux, tels que Bcl-2, et activent l'apoptose par la libération prématurée du cytochrome C dans le cytoplasme (Pasinelli et al., 2004). Des résultats récents suggèrent que TPD-43 mutée peut également endommager la morphologie mitochondriale chez des souris transgéniques (Xu et al., 2010 ; Wang et al., 2013). Le Pramipexole est un agoniste de la dopamine jouant un rôle important dans l'amélioration de la réponse oxydative (Pattee et al., 2003). Il permet l'augmentation de la production d'ATP et la réduction des espèces réactives d'oxygène et de l'apoptose (Bozik et al., 2011). Le Pramipexole a prouvé une action neuroprotectrice à la fois *in vitro* et *in vivo*, mais a récemment échoué dans un essai de phase III (Gribkoff et Bozik, 2008).

3.1.6 Stratégies thérapeutiques visant l'apoptose dans la SLA

Bien que controversé, il existe des preuves que l'apoptose mitochondriale semble jouer un rôle dans la SLA (Pasinelli et al., 2000 ; Friedlander, 2003). En effet, la suppression de certaines voies de l'apoptose mitochondriale chez les souris SOD1^{G93A} a fourni de fortes preuves de son implication dans la maladie (Reyes et al., 2010). Une meilleure compréhension et un ciblage de ces voies apoptotiques pourraient être un atout pour les études thérapeutiques de la SLA. Le Guanabenz est un médicament perméable à la BHE, approuvé par la FDA pour la médication anti-hypertensive. Ce composé s'est révélé neuroprotecteur dans des modèles de SLA liée à *TARDBP* (Vaccaro et al., 2013). Plus récemment, il a été étudié dans deux essais précliniques distincts utilisant les souris SOD1^{G93A} (Wang et al., 2014 ; Jiang et al., 2014). Les résultats de ces études suggèrent que le Guanabenz réduit le stress du RE en activant la voie UPR (Unfolded Protein Response) réduisant la quantité de SOD1 mutée.

3.1.7 Stratégies thérapeutiques via les facteurs neurotrophiques

Les facteurs neurotrophiques retardent l'apparition et la progression de la maladie en favorisant la neuroprotection et la régénération dans des modèles murins (Ciesler et Sari, 2013). Le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1) et le facteur neurotrophique dérivé de lignées de cellules gliales (GDNF) régulent la survie et la différenciation des neurones conduisant à une durée de vie allongée des souris transgéniques SOD1. Dans certains essais cliniques, l'IGF-1 a ralenti légèrement la progression de la maladie, mais ces résultats n'ont pas été confirmés dans des études ultérieures (Borasio et al., 1998 ; Lai et al., 1997). Un autre facteur neurotrophique, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) retarde la progression de la maladie et prolonge la survie chez les souris transgéniques SLA (Zheng et al., 2007) et dans les modèles de rat (Storkebaum et al., 2005). Les facteurs neurotrophiques sont malheureusement peu efficaces dans la SLA, en raison de leur faible biodisponibilité et de leur mauvaise transmission dans les MNs.

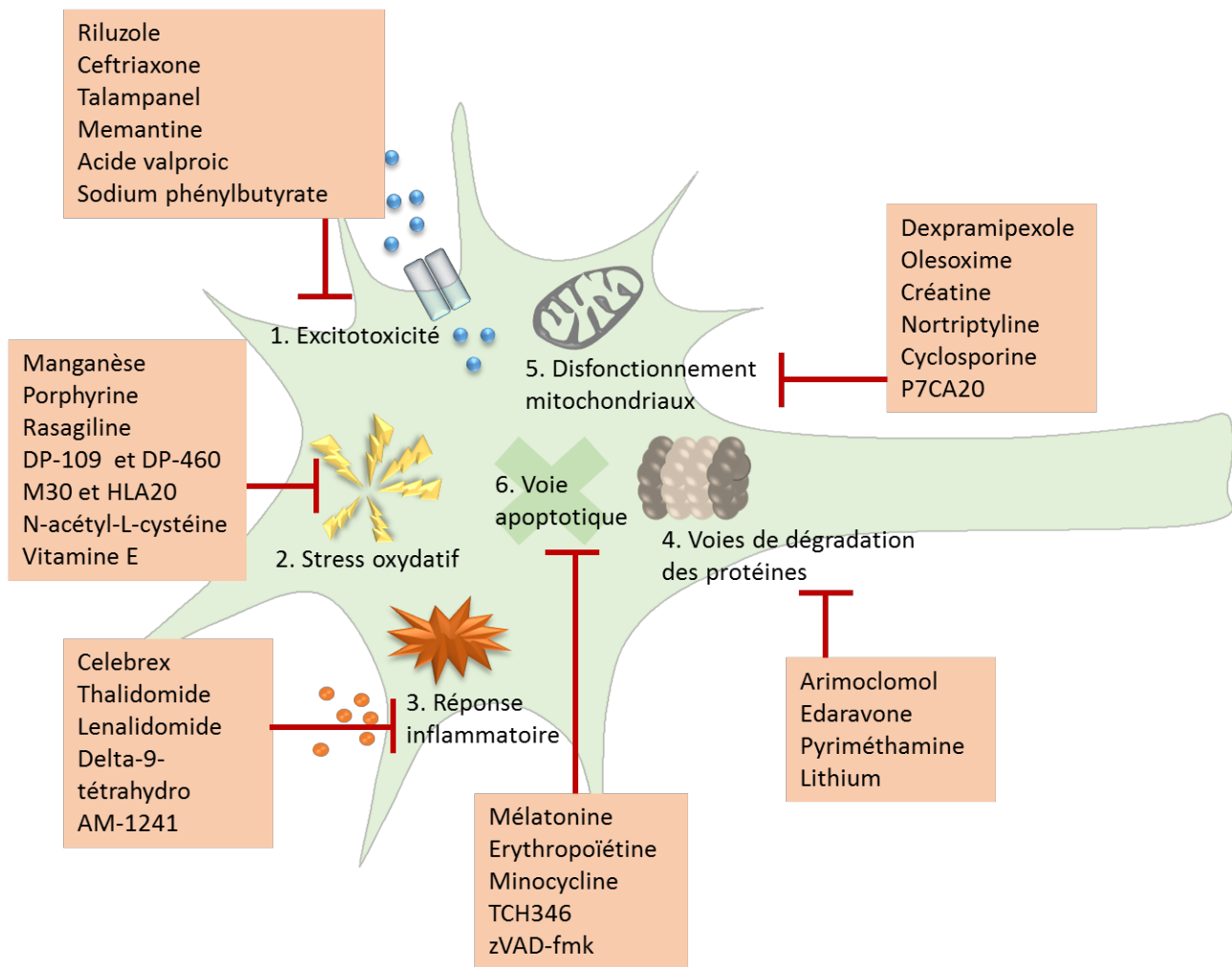


Figure 19: Les agents neuroprotecteurs et leur cible dans la pathogénèse de la SLA.

Dans cette image les différents mécanismes pathologiques ciblés par les stratégies thérapeutiques sont représentés. Pour chaque voie, les molécules thérapeutiques sont listées (modifié à partir de [Kumar et al., 2016](#)).

3.2 Stratégies thérapeutiques non pharmacologiques

3.2.1 Thérapie par cellules souches

Les résultats des thérapies par cellules souches, pour le remplacement et la régénération des neurones, ont apporté un grand espoir pour les patients atteints de SLA ([Maragakis, 2010](#)). De nombreux travaux précliniques ont été effectués dans les modèles murins de la SLA par transplantation de différents types de cellules comme les cellules souches embryonnaires (ESS), les cellules souches neurales (NSC), les cellules de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et les cellules souches mésenchymateuses (MSC) ([Giordano et al., 2007](#) ; [Kim et Vellis, 2009](#) ; [Meamar et al., 2013](#) ; [Thomsen et al., 2014](#)). La disponibilité des cellules souches pluripotentes induites (iPSC), qui peuvent être différenciées en populations neuronales spécifiques, ouvrent un champ captivant pour la recherche neurologique et le développement de stratégies thérapeutiques. Ces cellules permettent l'observation *in vitro* de l'initiation et de la

progression de la maladie, ainsi que l'élaboration de nouveaux traitements via l'utilisation des propres cellules du patient (Mattis et Svendsen, 2011 ; Papadeas et Maragakis, 2009). En 2008, les premiers iPSC humains de patients atteints de SLA ont été différenciés en MN (Dimos et al., 2008). Une transplantation de cellules souches squelettiques adultes a également été testée dans des cas de SLA (Mazzini et al., 2003). Bien que l'ère de la thérapie à base de cellules souches commence à peine, plusieurs essais de thérapie cellulaire pour la SLA ont été réalisés dans différents pays à travers le monde (Kumar et al., 2016).

3.2.2 Thérapie génique

La thérapie génique est une approche thérapeutique très prometteuse pour la SLA puisqu'elle assure une délivrance spécifique de « médicaments » aux cellules endommagées et surmonte la difficulté de franchir la BHE (Moreno-Igoa et al., 2010 ; Boillee et Cleveland, 2004 ; Miller et Cleveland, 2003). Elle peut être utilisée pour délivrer les gènes codant pour des facteurs neurotrophiques, des protéines anti-apoptotiques ou pour bloquer l'expression de gènes défectueux (Abe et Warita, 1999 ; Moreno-Igoa et al., 2010). Son avantage le plus important est que certains vecteurs viraux peuvent être administrés directement ou systémiquement au SNC pour transduire une cible cellulaire déterminée. Par exemple, le système rétrograde de distribution des vecteurs dérivés du Virus Adeno Associé (AAV) pour l'IGF-1 et le GDNF a démontré des avantages dans les modèles de souris SOD1 (Kaspar et al., 2003). Des injections intramusculaires de lentivirus exprimant le VEGF ou l'agent anti-apoptotique Bcl-2 ont également montré des résultats positifs dans les modèles de rongeurs (Azzouz et al., 2000 ; Azzouz et al., 2004).

Une autre approche thérapeutique consiste à bloquer l'expression de gènes qui provoquent la dégénérescence des MNs, tels que la SOD1 mutée. En effet, des oligonucléotides antisens ciblant la SOD1 mutée, administrés chez les rats SOD1^{G93A}, ont réduit le niveau de la protéine dans le cerveau et dans la moelle épinière et ont retardé la progression de la maladie (Smith et al., 2006). Sur la base de ces résultats, un essai clinique de phase I a récemment été réalisé par administration intrathécale d'oligonucléotides chez des patients atteints de SLA familiale liée aux mutations de SOD1 (Miller et al., 2013). D'autres parts, le vecteur AAV de sérotype 9 a été utilisé pour délivrer des ARNsh dirigés contre la SOD1 chez les souris SLA après une seule injection intravasculaire. Cette approche systémique a permis de prolonger la durée de vie des souris SOD1^{G93A} injectées à la naissance ou à l'âge adulte (Foust et al., 2013). Une autre étude utilisant le sérotype rh10 de l'AAV pour exprimer le micro-ARN artificiel (miARN) a également montré un ralentissement de la progression de la maladie et une survie prolongée chez les souris SOD1^{G93A} injectées par voie intrathécale à l'âge de 65 jours (Wang et al., 2014). Ces études et d'autres (Borel

et al., 2016 ; Stoica et al., 2016) ont révélé des résultats thérapeutiques encourageants et une application possible en clinique.

L'équipe au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse, a récemment développé une nouvelle approche d'extinction de SOD1 mutante chez les souris SLA. L'inhibition de la transcription de la SOD1 a été réalisée par saut d'un exon constitutif de la SOD1 (exon skipping) via l'utilisation d'oligonucléotides antisens complémentaires aux séquences régulatrices de l'épissage. L'ARNm en résultant contient alors un codon stop prématuré entraînant sa suppression par le système de dégradation des ARNm non-sens (*Nonsense-Mediated Decay* ou NMD) (Chang et al., 2007 ; Ward et al., 2014). Les oligonucléotides antisens dirigés contre la SOD1 mutée ont été insérés dans un vecteur AAV de sérotype 10 et incorporés dans un petit ARN nucléaire modifié U7. Les vecteurs AAV ont été délivrés dans le SNC et les organes périphériques, par la combinaison d'injections intraveineuse et intracérébroventriculaire. Cette stratégie de saut d'exon a présenté un potentiel thérapeutique élevé chez les souris SOD1^{G93A} nouveau-nées (P1) et adultes (à l'âge de 50 jours). Cette approche de thérapie génique a induit un saut d'exon de la SOD1 efficace dans la moelle épinière, entraînant une réduction importante des niveaux d'ARNm et protéique de SOD1. La survie des souris SOD1^{G93A} a été prolongée, avec une augmentation moyenne de l'espérance de vie de 92% et 58% pour les souris injectées à la naissance et à 50 jours, respectivement. L'apparition de la maladie a également été retardée de 95 et 63 jours, respectivement, par rapport aux souris non traitées. Enfin, l'inhibition de l'expression de la SOD1 mutée, via le vecteur AAV, a empêché la perte de poids et a préservé la fonction motrice et la force des muscles squelettiques (Biferi et al., 2017).

4 Les Adeno-Associated Virus (AAV) pour le transfert de gènes

Les vecteurs AAV recombinants (AAVr) présentent de nombreux avantages pour la thérapie génique et le transfert de gène en général. En effet, ils sont non pathogènes étant donné qu'ils ne contiennent plus de séquence virale et qu'ils sont capables de mener à l'expression de transgènes à long terme. Aucune toxicité n'a été décrite et seule une faible réponse inflammatoire a été observée après l'administration d'AAV dans le cerveau et la moelle épinière (Ruitenberget al., 2002).

4.1 Biologie de l'AAV

Les AAV sont de petits virus à ADN simple brin (4,7Kb), dépourvus d'enveloppe avec une capsid d'environ 25nm de diamètre (Bowles et al., 2006), appartenant à la famille des *Parvoviridae* et au genre des *Dependovirus* (Berns et Parrish, 2007). Ils ont la particularité d'être

naturellement non-réplicatifs en l'absence d'un virus auxiliaire, également appelé virus « helper » (un adénovirus ou un virus de l'Herpès) assurant leur réplication et la formation de la capside (Muzyczka et Berns, 2001).

Le génome des AAV est constitué d'un ADN linéaire simple brin d'environ 4700b présentant deux cadres de lecture, Rep et Cap, et trois régions promotrices (**figure 20**). Le gène Rep, sous contrôle des promoteurs p5 et p19, code pour 4 protéines non structurales (Rep78, 68, 52 et 40) (Büning et al., 2008).

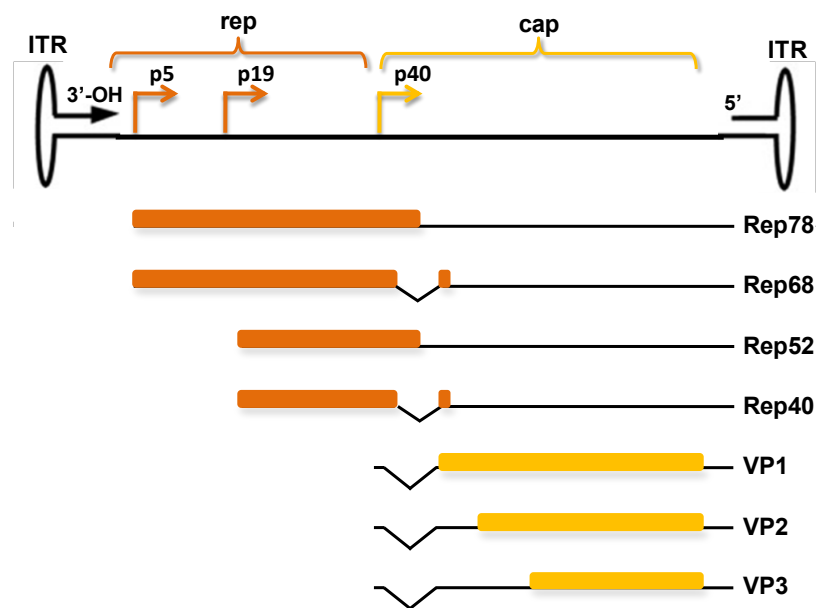


Figure 20 : L'organisation du génome de l'AAV (modifié à partir de Büning et al., 2008).

Les protéines Rep78 et Rep68 possèdent la capacité de se fixer à l'ADN et exercent des activités endonucléase, hélicase et ATPase, essentielles à la réplication du génome viral. Les deux protéines Rep mineures, Rep 52 et Rep 40, sont impliquées dans l'encapsidation du génome viral mais ne sont pas essentielles pour le cycle réplcatif du virus. Le gène Cap, sous contrôle du promoteur p40, code pour les protéines structurales VP1, VP2 et VP3 qui composent la capside. Ces gènes viraux sont encadrés par deux séquences terminales inversées et répétées, de 145 nucléotides, appelées ITR (Inverted Terminal Repeat) formant une structure secondaire en épingle à cheveux aux extrémités 5' et 3'. Les ITRs servent d'origine de réplication ainsi que d'amorce pour la synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase. En effet, les AAV ont naturellement leur ADN sous la forme de simple brin (AAVsb), qui est répliqué de façon complémentaire lors de l'infection dans la cellule hôte (Muzyczka et al, 2001 ; Sonntag et al, 2010).

En l'absence de virus helper, les AAV ont la capacité de rester sous forme d'épisomes ou de s'intégrer de manière stable dans le génome de la cellule hôte au niveau d'un seul site spécifique

qui est localisé dans le chromosome 19 humain (Muzyczka et Berns, 2001). Les AAV rentrent alors dans un état de latence jusqu'à ce qu'ils soient réactivés par surinfection de la cellule hôte d'un virus auxiliaire (Berns et al, 1996).

4.2 Les sérotypes

Plusieurs sérotypes ont été découverts par analyse des différences situées au niveau des protéines de la capsid virale. Un nouveau sérotype est déterminé lorsque le virus ne réagit pas avec des anticorps neutralisants dirigés contre les sérotypes existants et déjà caractérisés. Actuellement, 12 sérotypes d'AAV ont été caractérisés et classés de l'AAV1 à l'AAV12. Plus d'une centaine de variants ont été identifiés à partir de préparations d'adénovirus, d'origine humaine ou de primates non-humains. Les différents sérotypes d'AAV décrits diffèrent dans la séquence en acides aminés des protéines de leur capsid ainsi qu'au niveau de la séquence nucléotidique des ITRs (Gao et al., 2004 ; Grimm et al., 2003).

Les propriétés des différents sérotypes ont été essentiellement étudiées dans le contexte de leur utilisation comme vecteur de transfert de gène. En effet chaque sérotype possède un tropisme préférentiel d'infection qui est non exclusif pour un organe ou un type cellulaire. Par exemple, l'AAV2 infecte un grand nombre de types cellulaires, mais peu les cellules ciblées pour la thérapie génique comme le muscle, le foie et les cellules hématopoïétiques. Alors que l'AAV8 transduit de façon préférentielle le foie et le cœur ; l'AAV1 et l'AAV7 le muscle ; l'AAV5 la rétine ; et l'AAV9 et l'AAV10 le cerveau et la moelle épinière (Gao et al., 2004 ; McCown, 2011).

4.3 Le cycle viral répliatif

Après liaison à leur récepteur et corécepteur spécifique (comme l'héparane sulfate, la laminine ou les intégrines), les particules d'AAV sont internalisées par endocytose, dans des vésicules entourées de clathrine (**figure 21**). Une acidification de ces vésicules entraîne une modification de la capsid virale déclenchant l'externalisation d'un domaine protéique, ayant une activité phospholipase, permettant la sortie des particules des endosomes et leur accumulation autour du noyau cellulaire. L'entrée des AAV dans le noyau reste pour l'instant l'une des étapes les moins bien connues. Le génome AAV est ensuite décapsidé et converti en ADN double brin par la machinerie cellulaire. En l'absence de virus auxiliaire, le génome AAV sauvage persiste sous forme épisomale ou est intégré au génome de la cellule hôte via les protéines Rep. Pour les AAV recombinants, ne possédant plus le gène Rep, les épisomes circulaires représentent les formes majoritaires dans le noyau des cellules transduites (Ding et al. 2005).

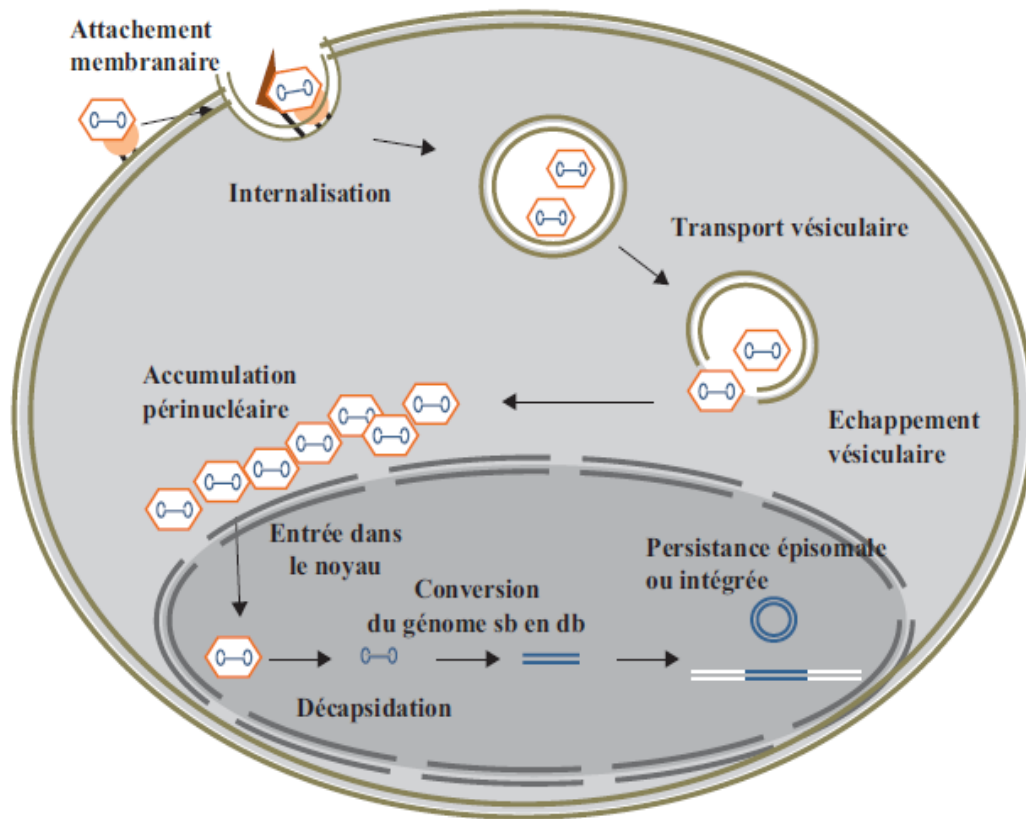


Figure 21 : Étapes majeures du trafic intracellulaire des particules d'AAV (d'après Millet et al., 2013).

La polymérase de la cellule hôte utilise l'extrémité 3' de l'ITR comme amorce pour la synthèse du brin complémentaire (**figure 22**). La réplication de l'ADN viral fait intervenir trois propriétés des protéines Rep78 et Rep68 : leur capacité à se lier sur le site RBE (Rep Binding Element) de l'ITR ; leur activité hélicase dépendante de l'ATP, permettant la séparation des deux brins d'ADN ; ainsi que leur activité endonucléase qui s'exerce sur un seul brin d'ADN au niveau du site TRS (Terminal Resolution Site) de l'ITR. Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont rapidement synthétisées et s'assemblent sous forme de capsides vides dans le noyau. L'encapsulation du génome viral se fait donc dans des particules préformées et fait intervenir l'activité hélicase des protéines Rep52 et Rep40 (Timpe et al., 2005).

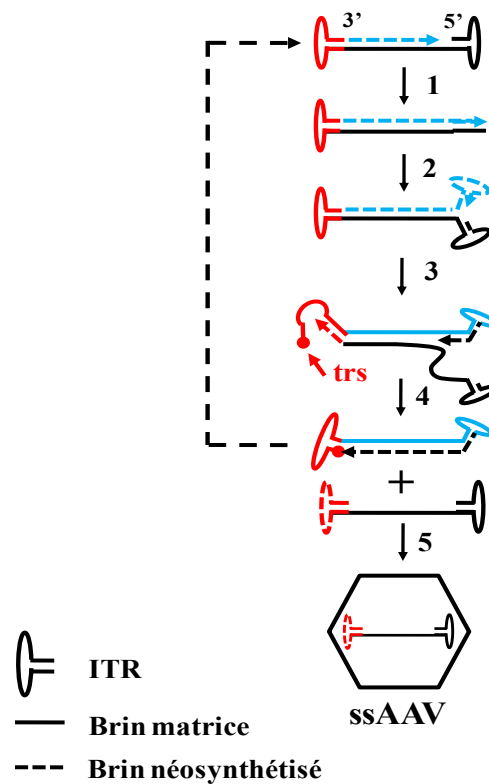


Figure 22 : Le cycle répliatif de l'AAV.

(1) La polymérase de la cellule hôte synthétise le brin complémentaire à partir de l'ITR 3' qui sert de matrice. L'élongation du brin se poursuit jusqu'à la réplication de l'ITR 5'. Cette étape est généralement appelée conversion du génome de l'AAV. (2) Les dimères d'ITRs se séparent et reforment des structures en épingle à cheveux (isomérisation). (3) Une endonucléase (Rep) vient se fixer sur la séquence *trs* de l'ITR 3' du brin matrice et le clive. Avant la séparation des deux brins, la polymérase synthétise l'ITR 3' du brin matrice. (4) Les deux brins peuvent aussi bien repartir dans le cycle de réplication, (5) que rentrer dans une capsid virale pour former un virion.

4.4 Les AAV recombinants

Les vecteurs AAVr utilisés pour le transfert de gènes sont composés d'une part de la capsid, responsable des propriétés antigéniques et du tropisme cellulaire, et d'autre part du transgène bordé par les séquences ITRs de l'AAV (en règle générale, les séquences ITR sont celles de l'AAV2). Le transgène est constitué d'un ADNc sous le contrôle d'un promoteur et suivi d'une séquence de polyadénylation.

La production des vecteurs recombinants est réalisée en apportant en *trans* les gènes Rep et Cap (du plasmide « pHelper ») et les fonctions adénovirales auxiliaires (plasmide pXX6 contenant les gènes E2a, VAI et E4). Généralement, la production est réalisée par la tri-transfection transitoire de cellules embryonnaires de rein humain 293 (HEK293) avec les plasmides pXX6, pHelper et le plasmide transgène contenant la cassette d'expression du transgène bordée par les deux ITRs de l'AAV2.

Le mécanisme d'intégration des AAV étant dépendant de Rep, les vecteurs AAVr ne possèdent pas théoriquement la capacité d'intégration au niveau du site spécifique des virus AAV sauvages. En effet, de nombreuses études ont montré que le génome de l'AAVr persiste principalement sous forme épisomale circulaire dans le noyau de la cellule. Cependant, une intégration aléatoire du génome de l'AAVr peut avoir lieu dans certains cas (souvent observée dans des cellules en division) mais cet événement est relativement rare (Schultz et Chamberlain, 2008).

L'efficacité de transduction des vecteurs AAV, pour un type cellulaire donné, dépend de la nature des récepteurs présents à la surface des cellules cibles ainsi que de la capacité de la cellule à internaliser et à transporter l'AAV jusqu'à son noyau. Leur efficacité de transduction dépend également du processus de décapsidation ainsi que de l'étape de conversion du génome, c'est-à-dire du passage d'un ADN simple brin à un ADN double brin (Ferrari et al., 1996 ; Fisher et al., 1996).

4.5 Développement de vecteurs AAVr double brin

Une des étapes clés pour une transduction efficace des cellules, est la conversion du génome des AAV d'un ADN simple brin à un ADN double brin, qui est en partie dépendante des protéines provenant du virus auxiliaire. En effet, lorsque l'AAV pénètre dans la cellule, les génomes viraux restent à l'état de molécules simples brins dans le noyau, limitant l'expression du transgène. Pour contourner l'étape limitante de la synthèse du brin complémentaire d'ADN, un mécanisme alternatif a été envisagé : l'encapsidation d'ADN double brin (ou sc pour self-complementary).

Les AAV ont la capacité d'encapsider des molécules d'ADN simple brin de polarité positive ou négative. De ce fait, si la taille du génome du vecteur recombinant est réduite à environ 2300 pb (la moitié de la taille du génome normal), les AAV peuvent encapsider dans un même virion deux ADN simple brin pouvant s'apparier s'ils sont complémentaires (encapsidation d'un brin positif et d'un brin négatif). Néanmoins, l'encapsidation de deux molécules d'ADN est un phénomène relativement variable d'une préparation virale à l'autre ; c'est pourquoi une délétion du site TRS sur l'ITR 3' permet d'augmenter le nombre de molécules double brin encapsidées lors de la production d'AAVr. En effet, lors de la synthèse du brin complémentaire, l'endonucléase Rep se fixe sur le site TRS du brin matrice et le clive. Si ce site est délété, la coupure du brin ne peut être exécutée ce qui conduit à la formation d'un ADN composée de deux ITRs sauvages localisés à chaque extrémité de la cassette d'expression du transgène (un dimère composé de la séquence répétée et inversée du transgène) et d'un ITR muté séparant les séquences complémentaires.

Cependant, une des limites des vecteurs AAVdb repose sur la taille du génome encapsidé. La taille du génome d'un AAVr est normalement limitée à 4700b ; elle est donc réduite de moitié dans le cas d'un AAVdb, soit environ 2300pb (McCarty et al. 2001 ; McCarty, 2008).

5 Modèles animaux pour les maladies neurodégénératives via les AAV

5.1 Avantages des vecteurs AAVr pour la modélisation animale

Comme alternative à la transgénèse classique, la création de modèle *in vivo* par transfert de gènes via un vecteur viral pourrait être une alternative plus rapide et moins coûteuse. Ce principe repose sur l'infection de cellules cibles par un virus renfermant le gène associé à la pathologie. Parmi les différents vecteurs viraux utilisés, les AAVr ont montré leur efficacité à produire des modèles animaux pour des maladies neurodégénératives. En effet, ces vecteurs suscitent beaucoup d'intérêt en raison de leur capacité à traverser la BHE (Duque et al., 2009) et de transduire le SNC, ou les organes périphériques après une injection intraveineuse chez les souris nouveau-nées et adultes, ainsi que chez les mammifères de grande taille (Duque et al., 2009 ; Foust et al., 2009). Par ailleurs, l'injection de vecteurs AAVr directement dans la moelle épinière (Azzouz et al., 2000 ; Lepore et al., 2007 ; Franz et al., 2009) ou dans le cerveau permet de contourner certaines difficultés posées par la dissémination des MNS dans tout le système nerveux et par la présence de la BHE. L'injection directe de vecteurs AAVr par voie intracérébroventriculaire (ICV), notamment, permet d'augmenter la diffusion du vecteur par le liquide céphalorachidien et, par conséquent, l'expression du transgène dans l'ensemble du SNC (Passini et al., 2003 ; Fedorova et al., 2006 ; Storek et al., 2006 ; Broekman et al., 2007).

5.2 Modèles animaux pour les maladies neurodégénératives via les AAVr

5.2.1 Modèle murin pour la SLA-DFT liée à C9ORF72

Parmi les maladies neurodégénératives modélisées par le transfert de gène à l'aide d'AAVr, la SLA et la DFT familiales causées pour la majorité des cas par la mutation du gène C9ORF72, ont été induites chez la souris (Chew et al., 2015). L'injection d'AAV9, renfermant 66 répétitions de l'hexanucléotide GGGGCC, dans le SNC de souris sauvages nouveau-nées a permis d'induire de nombreuses caractéristiques histopathologiques de la SLA-DFT liée à C9ORF72 ; à savoir des foyers d'ARN nucléaires, des inclusions protéiques (portant des répétitions de poly (Gly-Pro), de poly (Gly-Ala) et de poly (Gly-Arg)), la protéinopathie TDP-43, une perte des cellules neuronales corticales et des cellules de Purkinje, une astroglie ainsi qu'une diminution du poids cérébral

observés 6 mois après l'injection d'AAVr. Les 66 répétitions de l'hexanucléotide ont également entraîné des anomalies comportementales similaires aux symptômes cliniques observés chez les patients atteints de SLA-DFT liée à *C9ORF72*, comme l'hyperactivité, l'anxiété, un comportement asocial et des déficits moteurs.

Cette étude montre donc la capacité d'induire le développement de caractéristiques histologiques et phénotypiques de la SLA-DFT associée à *C9ORF72* par le transfert du gène muté dans les cellules du SNC à l'aide de vecteurs AAVr. Ce modèle est donc utile pour l'étude de la physiopathologie de cette forme de SLA-DFT familiale ainsi que pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

5.2.2 Modèle de rat surexprimant p62

P62 fait partie des protéines les plus fréquemment détectées dans les inclusions intra-neuronales de maladies neurodégénératives telles que la SLA (Fecto et al., 2011) et la DFT (Fecto et Siddique, 2012 ; Le Ber et al., 2013), ainsi que dans les enchevêtrements neurofibrillaires pour la maladie d'Alzheimer et dans les corps de Lewi pour la maladie de Parkinson (Kuusisto et al., 2001 ; Geetha et al., 2012). Afin de savoir si la surexpression de la forme sauvage de p62 peut induire la formation d'inclusions neuropathologiques et à la dégénérescence des neurones, Jackson et ses collaborateurs ont généré un modèle de rat surexprimant la forme sauvage de p62 (Jackson et al., 2017). Pour cela, des AAV9 portant la séquence humaine sauvage de *p62* ont été injectés dans le cerveau de rats âgés de 12 semaines. La surexpression de p62 a alors induit la formation d'inclusions cytoplasmiques positives pour p62 (abondantes dans le péricaryon et dans les dendrites des neurones) seulement 5 jours après le transfert de gènes. Les inclusions pourraient être responsables de l'hypertrophie des neurones observée trois semaines après l'injection d'AAV9. Des inclusions positives pour l'ubiquitine et l'ubiquiline 2 (impliquées comme p62, dans les voies de dégradation protéique) ont également été mises en évidence dans les neurones du cerveau des rats modèles. Trois mois après l'injection d'AAV9, les rats ont développé un phénotype comportemental pathologique relatif à la perte neuronale observée par les analyses *post-mortem*.

Etant donné que p62 est communément retrouvée dans les inclusions neuronales des patients atteints de forme familiale ou sporadique de la SLA (Deng et al., 2011), cette étude a permis de modéliser la plupart des cas de SLA en surexprimant la forme sauvage de p62 dans les neurones transduits par l'AAV9.

5.2.3 Modèles murins pour la SLA-DFT liée à l'UBQLN2

Pour étudier la SLA-DFT associée aux mutations de l'ubiquiline 2, trois modèles murins non transgéniques ont également été générés par injection ICV de vecteurs AAV8 portant les séquences d'ADN mutées de l'ubiquiline 2 humaine (AAV8-Ub2^{P497S} ; AAV8-Ub2^{P497H} ; AAV8-Ub2^{P506T}) chez des souris sauvages nouveau-nées (Ceballos-Diaz et al., 2015). Selon le même principe, un modèle surexprimant la forme sauvage de l'ubiquiline 2 a aussi été généré à l'aide de vecteur AAV8-Ub2. L'expression de ces gènes a été placée sous le contrôle du promoteur de l'ubiquiline 2 humaine. Une séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional regulatory element) a été ajoutée, en aval de ces gènes, afin d'augmenter la quantité de protéines produites.

Chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 mutée ou sauvage, les analyses du niveau d'expression de l'ubiquiline 2 ont révélé une augmentation des formes murine et humaines de l'ubiquiline 2 soluble, 6 mois après l'injection de vecteurs AAVr comparées à 3 mois. L'ubiquiline 2 humaine insoluble a été détectée uniquement chez les souris surexprimant la protéine mutée. Dès un mois après l'injection d'AAV8-Ub2 ou d'AAV8-Ub2^{P497S} ou ^{P497H} ou ^{P506T}, l'ubiquiline 2 est fortement exprimée dans les neurones localisés dans plusieurs régions du cerveau (dont le cortex, l'hippocampe et le cervelet) par rapport aux souris injectées avec l'AAV8-EGFP (souris contrôles). L'injection d'AAV8-Ub2 chez les souris sauvages a conduit à la formation d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 dans le cytoplasme des neurones (au niveau du soma et des dendrites), alors que l'injection d'AAV8-Ub2^{P497S} ou ^{P497H} ou ^{P506T}, a conduit à la formation d'inclusions positives pour l'ubiquiline 2 dans le noyau et le cytoplasme des neurones ainsi que des agrégats d'ubiquiline 2 au niveau du neuropile. Dans le cervelet des souris surexprimant la protéine mutée, l'ubiquiline 2 est nettement présente dans les dendrites des cellules de Purkinje où l'architecture branchique semblait réduite par rapport à celle observée chez les souris injectées avec l'AAV8-Ub2. Les agrégats d'ubiquiline 2 ont été observés uniquement dans les cellules neuronales ; l'ubiquiline 2 humaine (sauvage ou mutée) s'exprime donc spécifiquement dans les neurones. De plus, les protéines ubiquitine et p62 ont été détectées dans les agrégats d'ubiquiline 2 observés dans le cortex et l'hippocampe des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine (sauvage ou mutée). La protéine TDP-43 phosphorylée, quant à elle, a été mise en évidence dans les agrégats cytoplasmiques uniquement dans le cerveau des souris injectées avec l'AAV8-Ub2^{P506T}. Malgré la présence d'un nombre important d'inclusions chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 mutée, aucune neurodégénérescence n'a été observée à 6 mois. Cette absence de perte neuronale pourrait s'expliquer par le faible pourcentage de neurones transduits (estimé entre 30 et 40% maximum dans les régions les plus proches des ventricules) par rapport au modèle de Wu et ses

[collaborateurs \(2015\)](#) qui présente une neurodégénérescence. Toutefois, des troubles neurologiques (un phénotype de « clasping ») et de la coordination motrice ont été observés chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 mutée (3-4 mois post-injection).

L'injection de vecteurs AAV2/8 par voie ICV chez des souris sauvages nouveau-nées a donc permis de générer des modèles surexprimant la protéine mutée (P497H, P497S ou P506T) et de démontrer que la surexpression de ces formes mutées induit la formation d'agrégats insolubles, une protéinopathie dans les neurones ainsi que des troubles comportementaux. Ainsi, ces résultats soutiennent l'idée que les mutations de l'ubiquiline 2 lui confèrent un gain de fonction "toxique" perturbant la protéostasie dans les neurones, qui pourrait contribuer à la pathologie de la SLA. Toutefois ce modèle ne récapitule pas l'ensemble des symptômes moteurs et cognitifs de la maladie.

5.2.4 Modèle porcin pour l'amyotrophie spinale (SMA)

Cette méthode a été utilisée pour la génération de modèles animaux de grande taille pour des études précliniques, dont un modèle porcin de SMA.

La SMA est causée par des niveaux réduits de la protéine SMN, essentielle pour la survie des MNs, entraînant une perte de MNs dans la moelle épinière accompagnée d'une faiblesse musculaire ([Burghes et Beattie, 2009](#) ; [Arnold et Burghes, 2013](#)). L'équipe de Burghes a induit une réduction postnatale de SMN dans les MNs entraînant un phénotype SMA dans un animal de grande taille via l'administration d'AAV9 ([Duque et al., 2015](#)). Pour réaliser cette étude, des porcs sains âgés de 5 jours ont été injectés par voie intrathécale avec des vecteurs AAV9 renfermant des ARNsh dirigés contre le gène *SMN* (*Survival Motor Neurons*) dans le but de réduire son niveau d'expression.

Trois à quatre semaines après l'injection des vecteurs AAV9-SMNsh, les porcelets ont développé une faiblesse musculaire, en particulier dans les membres postérieurs. Les signes cliniques initiaux se sont caractérisés par une démarche anormale et une position debout difficile à respecter pendant des périodes prolongées. Les porcelets ont ensuite perdu la capacité de se tenir debout indépendamment en développant également une faiblesse dans leurs pattes avant. L'atrophie et la faiblesse musculaire des membres postérieurs et les fasciculations se sont développées en même temps. D'autre part, les porcelets se sont comportés normalement sans aucune altération apparente de leur vigilance, leur appétit, leur capacité d'avalier ou de leur capacité respiratoire.

Des analyses histologiques sur des animaux sacrifiés au stade final ont montré que l'injection intrathécale de l'AAV9-SMNsh induit divers changements histopathologiques dans les

MNs spinaux. Par exemples, de nombreux MNs ont présenté une perte axonale importante, un gonflement du corps cellulaire et une dégénérescence de la chromatine nucléaire. Une diminution significative du nombre de MNs chez ce modèle SMA, comparé aux animaux contrôles, a également été observée. Avec cette méthode un modèle de SMA de grande taille a donc été généré.

En conclusion, les vecteurs dérivés de l'AAV permettent de générer rapidement des modèles de maladies neurodégénératives, aussi bien chez de petits animaux que chez des animaux de plus grande taille comme le cochon, pouvant être utilisés pour tester des drogues dans le cadre d'études pré-cliniques.

OBJECTIFS

L'une des caractéristiques pathologiques de plusieurs formes de SLA est la présence d'agrégats de protéines ubiquitinylés dans les tissus affectés, tels que la moelle épinière, le cortex fronto-temporal, l'hippocampe et le cervelet (Al-Chalabi *et al.*, 2012). Le mécanisme impliqué dans la formation de ces agrégats reste cependant inconnu.

En 2011, Deng et ses collaborateurs ont identifié cinq mutations dans le gène *UBQLN2* (Deng *et al.*, 2011), codant pour une protéine de type ubiquitine, l'ubiquiline 2, dans des formes héréditaires de SLA et de SLA-DFT liées au chromosome X. Au sein de mon laboratoire de thèse, nous nous sommes intéressés à cette protéine en raison de son implication dans la voie de dégradation protéique via la protéasome. En effet, l'étude des mutations liées à la maladie pourrait aider à mieux comprendre le mécanisme de production des agrégats protéiques dans la pathogénèse de la SLA.

De façon intéressante, les agrégats positifs à l'ubiquiline 2 ont été observés dans la moelle épinière de patients atteints de SLA ainsi que dans le cerveau de patients atteints de SLA-DFT, avec ou sans mutations du gène *UBQLN2*. Cela suggère que les inclusions positives à l'ubiquiline 2 pourraient participer à un processus pathologique commun impliqué dans la SLA familiale mais aussi dans les formes plus fréquentes de SLA sporadique.

Le rôle de l'ubiquiline 2 dans la pathogénèse de la SLA et de la SLA-DFT n'est pas encore complètement déterminé. Nous avons donc décidé de développer un nouveau modèle animal pour la SLA liée aux mutations de l'*UBQLN2*, afin de mieux comprendre les mécanismes pathologiques de cette forme de SLA et, de façon plus générale, d'analyser son implication dans la pathogénèse des différentes formes de SLA. La génération de ce modèle animal pourra être utile pour étudier la formation d'agrégats protéiques *in vivo* mais également pour élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la SLA et la SLA-DFT.

Objectif 1 – Génération du modèle animal

Mon projet de thèse a consisté, dans un premier temps, à générer un nouveau modèle animal de SLA liée à l'*UBQLN2*. De récentes recherches menées dans mon laboratoire d'accueil sur le transfert de gène à l'aide d'AAV, ont montré la capacité de l'AAV10 à transduire efficacement les cellules du SNC telles que les MNs (Tanguy *et al.*, 2015). Grâce à ces caractéristiques, des thérapies innovantes pour les maladies du MN, et en particulier pour la SLA liée aux mutations du gène *SOD1*, ont été développées (Biferi *et al.*, 2017).

Comme alternative à la transgénèse classique, nous avons donc choisi de créer notre modèle à l'aide de vecteurs AAV10 afin de surexprimer, chez la souris, une forme mutée de l'ubiquiline 2 humaine (l'ubiquiline 2^{P497H}) responsable de la SLA-DFT. Pour cela, nous avons injecté ces vecteurs viraux renfermant la séquence d'ADNc de l'ubiquiline 2^{P497H} humaine dans les ventricules cérébraux de souris sauvages nouveau-nées, afin de transduire un maximum de cellules du SNC. En parallèle, nous avons également généré un modèle surexprimant la forme sauvage de l'ubiquiline 2 humaine, ainsi qu'un modèle exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP) comme contrôle.

Objectif 2 – Caractérisation du modèle animal

Dans le but de caractériser ce nouveau modèle animal d'un point de vue histologique, biochimique, phénotypique et comportemental, nous avons effectué différentes analyses pour vérifier :

- 1)** si la surexpression de l'ubiquiline 2 mutée ou sauvage provoque la formation d'agrégats protéiques dans les cellules du cerveau et de la moelle épinière, comme observée chez les patients décrits par Deng et ses collaborateurs 2011 ;
- 2)** si le modèle *in vivo* récapitule l'ensemble des signes typiques de la SLA, avec ou sans DFT, dans le cerveau, la moelle épinière et le muscle squelettique ;
- 3)** si les mutations de l'ubiquiline 2 induisent des altérations perturbant ses interactions avec d'autres protéines.

Objectif 3 – Essai d'un traitement sur le modèle

Diverses approches thérapeutiques pour réduire la formation d'agrégats pathologiques dans les maladies neurodégénératives ont été développées au cours du temps (Tsai et Boxer, 2016). Le bleu de méthylène (BM), par exemple, est une molécule approuvée par la FDA pour plusieurs pathologies (Schirmer et al., 2011). Le BM a montré des résultats très encourageants pour réduire à la fois le nombre d'agrégats pathologiques mais également améliorer le phénotype dans certaines maladies neurodégénératives, comme dans les maladies d'Alzheimer, de Huntington et dans la DFT (Wischik et al., 1996; Arai et al., 2010; Sontag et al., 2012).

Nous avons donc testé le BM sur les souris injectées avec l'AAV10 exprimant l'ubiquiline 2 mutée ou sauvage, afin de démontrer s'il était capable de réduire les inclusions positives pour l'ubiquiline 2. Ce test a été conçu comme ultime étape de validation de notre modèle et comme vérification d'un possible intérêt thérapeutique du BM dans les cas de SLA liée à l'ubiquiline 2.

Projet collaboratif – Analyse des JNM dans un modèle de SLA liées aux mutations de *SOD1*

Au sein de l'équipe, j'ai également travaillé sur un projet de thérapie génique, dont l'objectif a été de réduire la quantité de la SOD1 humaine mutée dans le modèle de souris SOD1^{G93A}. Le traitement a consisté à injecter par voies intraveineuse (IV) et intracérébroventriculaire (ICV), chez les souris nouveau-nées ou âgées de 50 jours, des vecteurs AAV10 renfermant une séquence d'oligonucléotides antisens capable de provoquer un saut d'exon dans l'ARN pré-messager de la SOD1 humaine. Ce saut d'exon a ainsi conduit à la formation d'un ARN messager avec un codon stop prématuré activant la voie de dégradation des ARNm porteurs de codon non-sens (the Nonsense-Mediated mRNA Decay pathway, NMD). L'efficacité de ce traitement a ensuite été vérifiée par diverses analyses physiopathologiques comme l'analyse des jonctions neuromusculaires (JNM). Cette étude a été effectuée grâce à un marquage par immunofluorescence des neurofilaments et des récepteurs à l'acétylcholine présents sur les plaques motrices. Le but de mon travail dans ce projet a été de regarder si l'amélioration du phénotype moteur observée chez les souris traitées pouvait s'expliquer par la préservation des JNM (Biferi *et al.*, 2017).

Matériels

et

méthodes

1 Plasmides et clonage

Les séquences d'ADNc codant pour les formes sauvage et mutée de l'ubiquiline 2 humaine ont été synthétisées par GeneART. La séquence mutée de l'*UBQLN2* humaine code pour une protéine portant la mutation Pro497His, qui a récemment été identifiée chez des patients atteints de SLAf liée à l'*UBQLN2* (Deng et al., 2011). Après la digestion des plasmides GeneART par les enzymes de restriction BamHI et EcoRV, les séquences sauvage ou mutée de l'*UBQLN2* ont été insérées dans le plasmide d'expression pcDNA3.1/*myc*-His (Invitrogen) à l'aide de la ligase d'ADN Fast-Link (Epicenter), donnant ainsi les vecteurs d'expression pcDNA-Ub2 et pcDNA-Ub2Mut respectivement.

Pour le clonage des plasmides AAV, les séquences codantes de l'ubiquiline 2 humaine (sauvage et mutée) ont été amplifiées par PCR (Master Mix Phusion High-Fidelity PCR, Thermo Scientific) avec les amorces UbqFw et UbqRev (**tableau 4**) à partir des vecteurs d'expression pcDNA-Ub2 et pcDNA-Ub2Mut. La séquence codante de la GFP a été amplifiée par PCR (Master Mix PCR, Promega) avec les amorces GFPfw et GFPRev (**tableau 4**). Ces séquences amplifiées ont ensuite été insérées dans le site de restriction Nhe I d'un plasmide AAV simple brin à l'aide de l'ADN ligase Fast-Link (Epicenter), en aval du promoteur ubiquitaire PGK (PhosphoGlycérate Kinase) et d'une séquence intronique. La séquence codante de l'élément WPRE a été amplifiée à partir du plasmide pG3_221112_GFP_alb (provenant de la banque de plasmides de Généthon) par PCR (Master Mix PCR, Promega) avec les amorces FwWPRE et RevWPRE (**tableau 4**). Cette séquence a ensuite été insérée dans le site de restriction BglII des plasmides précédemment produits, contenant la séquence codante de la GFP, de l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou de l'ubiquiline 2 humaine mutée, en amont de l'ADNc. Ces plasmides ainsi produits ont été appelés AAV-GFP, AAV-Ub2 et AAV-Ub2Mut.

Tableau 4 : Séquence des amorces.

Amorce	Séquence	Taille de l'amplicon (pb)	Fournisseur
UbqFw	5'ATAATAGCTAGCATGGCTGAGAACGGCGAGTC 3'	1995	Eurogentec
UbqRev	5'ATAATAGCTAGCTCAGCTAGGCTGGCTGCCCA 3'		Eurogentec
FwWPRE	5'ATAATAAGATCTAATCAACCTCTGGATTACAA 3'	592	Eurogentec
RevWPRE	5'ATAATAAGATCTCAGGCGGGGAGGCGGCCAA 3'		Eurogentec
GFPfw	5'ATAATAGCTAGCATGGTGAGCAAGGCGGAGGA 3'	741	Eurogentec
GFPRev	5'ATAATAGCTAGCTTACTTGACAGCTCGTCCA 3'		Eurogentec

2 Culture cellulaire, transfection et analyses

2.1 Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires NSC-34 (Neuroblastoma x Spinal Cord cells), Neuro2a (Neuroblastoma) et HEK293T (Human Embryonic Kidney cells) ont été cultivées dans du milieu DMEM à 4,5g/L de glucose (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) avec 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal, Gibco) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco). Les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂.

2.2 Transfection

Les cellules NSC-34 et Neuro2a ont été transfectées avec différents plasmides : pCMV-GFP (nommé « vecteur GFP »), les vecteurs d'expression pcDNA-Ub2 ou pcDNA-Ub2Mut, les plasmides AAV10-GFP, AAV10-Ub2 ou AAV10-Ub2Mut, à l'aide d'un agent de transfection, la Lipofectamine (Invitrogen ; 18324-012), selon les instructions du fournisseur. La quantité de plasmide transfectée pour les analyses par immunofluorescence était de 0,75µg et pour les analyses par western blot de 3µg.

Pour les différents marquages par immunofluorescence, les cellules ont été fixées 72h après transfection avec une solution de paraformaldéhyde à 4% (PFA 4%) / PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline, Gibco). Concernant les expériences de western blot, les cellules ont été collectées 48h après transfection.

2.3 Immunofluorescence sur cellules

Les cellules NSC-34 et Neuro2a ont été fixées pendant 10 minutes dans une solution de PFA 4% / PBS 1X, perméabilisées pendant 10 minutes dans du tritonX-100 à 0,1% / PBS 1X puis bloquées pendant 30 minutes dans de la BSA 5% / PBS 1X. Les cellules ont été incubées avec un anticorps primaire anti-ubiquiline 2 de souris (1/500; H00029978-M03, Abnova) puis après lavage, avec un anticorps secondaire anti-souris Alexa 594 (1/200).

3 Production de vecteurs AAVr

Les vecteurs AAV10 exprimant l'ubiquiline 2 sauvage (AAV10-Ub2) ou l'ubiquiline 2 mutée (AAV10-Ub2Mut) ou la GFP (AAV10-GFP) ont été produits par tri-transfection de cellules HEK293T selon le protocole décrit par [Dominguez et al. \(2011\)](#). Les cellules ont été transfectées avec le plasmide helper adénoviral pXX6, le plasmide codant pour la capsid AAV10rh (portant les gènes rep2 et cap-Rh10) et le plasmide AAV codant pour l'ubiquiline 2 humaine (sauvage ou mutée) ou la GFP. Les vecteurs viraux recombinants ont été purifiés par ultracentrifugation sur un gradient d'iodixanol ([Hermens et al., 1999](#)). La préparation virale a été dessalée et concentrée avec des unités de filtration (Amicon Ultra-Ultra cell 100K, Millipore). Les vecteurs ont ensuite été aliquotés et stockés à -80°C. Les titres des vecteurs ont été déterminés par RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) et exprimés en nombre de génomes viraux par ml (gv/ml) (**tableau 5**).

Tableau 5 : Titre des vecteurs AAVr.

Vecteur AAVr produit	Titre en gv/ml
AAV10-GFP	$7,6 \cdot 10^{12}$ gv/ml
AAV10-Ub2	$3 \cdot 10^{11}$ gv/ml
AAV10-Ub2Mut	$5 \cdot 10^{12}$ gv/ml

4 Expérimentations animales

4.1 Lignée murine

Les souris de type sauvage FVB, provenant du fournisseur JANVIER LABS ont été maintenues dans les conditions standard d'élevage ($21 \pm 1^\circ\text{C}$, $66 \pm 5\%$ d'humidité, cycles de 12 heures de lumière / 12 heures dans l'obscurité, nourriture et eau ad libitum). Toutes les expériences *in vivo* ont été réalisées selon les directives européennes pour le soin et l'utilisation des animaux expérimentaux et approuvées par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale Charles Darwin N.5 (numéro d'agrément : 04830.02).

Nos travaux ont été réalisés sur autant de femelles que de mâles. Les souris ont été observées tous les jours et pesées une fois par semaine.

4.2 Injections d'AAVr

Les souris sauvages nouveau-nées FVB ont été injectées en Intra Cérébro Ventriculaire (ICV) avec l'AAV10-GFP, l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut. Une première injection dans le ventricule cérébral droit a été effectuée à J0 et une deuxième injection dans le ventricule gauche a été effectuée à J1 (soit $7 \cdot 10^{10}$ génomes viraux au total par souris, volumes injectés: 2 x 10 μ l). Cette

administration en ICV a été réalisée à environ 1 mm latéralement de la suture sagittale et à 1 mm antérieurement de la suture coronale par perforation du crâne à l'aide d'une seringue Neuros Hamilton (32G, longueur de l'aiguille 30mm).

4.3 Injection du bleu de méthylène (BM)

Les souris injectées avec les vecteurs AAV10-Ub2 et AAV10-Ub2Mut ainsi que les souris contrôles non injectées ont reçu des injections intrapéritonéales d'une solution de BM/NaCl à 0,4mg/ml (4mg/kg par injection) ou d'une solution de NaCl à 0,9% comme contrôle, 3 fois par semaine durant 1 mois.

5 Histologie

5.1 Immunofluorescence sur tissus

Les souris ont été sacrifiées à l'âge d'un ou deux mois, par anesthésie en surdosage avec un mélange de Ketamine (100mg/kg) / Xylazine (10mg/kg) (Rompun) et perfusées par voie transcardiaque avec du PBS 1X puis avec une solution de PFA 4% / PBS 1X. Les muscles *Tibialis anterior* et triceps ont été prélevés après la perfusion avec du PBS 1X, puis congelés dans de l'isopentane refroidi dans la carboglace. Le cerveau et la moelle épinière ont été fixés par une perfusion de PFA à 4% / PBS 1X puis ont été prélevés. Les cerveaux et les moelles épinières ont ensuite été déshydratés pendant 24h dans une solution de sucrose à 15% et 30% respectivement avant d'être congelés dans de l'isopentane refroidi avec de la carboglace (température entre -45 et -50°C). Les tissus congelés ont été coupés en série au cryostat (sections de 16µm pour le cerveau, 14µm pour la moelle épinière et 8µm pour les muscles) et conservés à -80°C.

Les cryosections de tissus de souris ont été fixées dans une solution de PFA 4% / PBS 1X pendant 20 minutes et perméabilisées avec du TritonX-100 0,1% / PBS 1X pendant 10 minutes. Après plusieurs lavages dans du PBS 1X, les sections ont subi une procédure de démasquage antigénique avec deux incubations de 5 minutes à 85°C dans un tampon citrate (0,01M, pH6). Les coupes ont ensuite été bloquées avec une solution de BSA à 5% / sérum normal de chèvre ou d'âne à 10% / TritonX-100 à 0,1% / PBS 1X et incubées avec les différents anticorps primaires: anti-GFP de lapin (1/1500; ab6556, Abcam), anti-ubiquilines 2 de souris (1/500; H00029978-M03, Abnova), anti-ubiquitine de lapin (1/200; Z0458, Dako), anti-p62 de souris (1/250; H00008878-M01, Abnova), anti-ChAT de chèvre (1/50; AB144P, Millipore), anti-laminine de lapin (1/300 ; Dako, Z0097) et anti-GFAP de lapin (1/250; Z0334, Dako). Après plusieurs lavages, les sections ont été incubées avec l'anticorps secondaire approprié : anti-chèvre Alexa 488 (1/750 ; Invitrogen,

A11055), anti-souris Alexa 488 (1/300 ; Invitrogen, A21121) ou Alexa 594 (1/500 ; Life Technologies, A11032), anti-lapin Alexa 488 (1/200 ; Invitrogen, A11034) ou Alexa 594 (1/200 ; Invitrogen, A11012).

5.2 Coloration des fibres oxydatives

Les fibres oxydatives de *Tibialis anterior* (sections de 8µm d'épaisseur) ont été mises en évidence par coloration des fibres NADH positives avec une solution de NADH (0,4 mg/ml) / NBT (0,8 mg/ml) diluée dans du Tris / HCl (0,1M pH7,4) à 37°C pendant 30 minutes. Le pourcentage de fibres oxydatives NADH(+) a été déterminé pour chaque groupe et les pourcentages ont ensuite été comparés statistiquement à l'aide du test de Student (n=3 par condition).

5.3 Analyses histopathologiques au microscope

Les images ont été acquises en utilisant un microscope confocal (LEICA DM2500) ou un microscope à fluorescence (ZEISS Axio observer.A1, Nikon Eclipse Ti, Leica DFC300 FX).

Le comptage du nombre de MNs ChAT positifs (diamètre >20µm) a été effectué sur environ 60 coupes de moelle épinière (régions cervicale, thoracique, lombaire) de souris sacrifiées à un mois, au microscope à fluorescence Nikon Eclipse Ti. La quantité moyenne de MNs ChAT positifs a été ensuite calculée pour chaque groupe et les analyses statistiques ont été faites à l'aide du test ANOVA, post-test de Bonferroni (n=5 par condition).

Pour l'étude de l'astroglie, l'intensité de fluorescence (exprimée en unité arbitraire) du marquage de la GFAP sur les coupes de moelle cervicale, a été réalisée avec le logiciel Image J. La moyenne d'intensité de fluorescence a ensuite été calculée pour chaque groupe et les analyses statistiques ont été faites à l'aide du test ANOVA, post-test de Bonferroni (n=3 par condition).

La mesure de l'aire et du nombre de fibres musculaires a été réalisée sur des coupes de *Tibialis anterior* marquées par immunofluorescence de la laminine à l'aide du logiciel Image J. La moyenne a été calculée pour chaque groupe et rapportée à l'aire totale de chaque section calculée en micromètre carré et les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test ANOVA, post-test de Bonferroni (n=6 par condition). Le comptage du nombre d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 (marquée par immunofluorescence) dans les cornes ventrales a été réalisé sur 10 coupes de moelle épinière par souris (souris traitées au NaCl ou au BM) (6 pour la partie cervicale et 4 pour la partie lombaire) à l'aide du logiciel Image J. La moyenne a ensuite été calculée pour chaque

groupe et les analyses statistiques ont ensuite été faites à l'aide du test de Student (n=3 par condition).

5.4 Stéréologie

Des cerveaux des différents groupes de souris préalablement fixés en PFA ont été inclus en agarose et coupés au vibratome en sections transversales de 40 µm d'épaisseur. Le volume de chaque section a ensuite été mesuré à l'aide du logiciel Image J (en mm³) et la somme des volumes a été calculée pour obtenir le volume du cerveau entier. De la même façon, le volume de la région corticale du cerveau a été mesuré. Les analyses statistiques ont ensuite été faites avec le test de Student, à partir des moyennes calculées pour chaque groupe (n=3 par condition).

6 Analyses protéiques

6.1 Western blot

A partir de cellules NSC-34, de tissus frais humains (échantillons de cortex et de moelle épinière) et de muscles de souris (directement congelés en azote liquide), les protéines ont été extraites à l'aide d'un tampon de lyse (1% RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) / 0,1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) / un inhibiteur de protéases (Roche ; 11 836 153 001). Les tissus frais ont été lysés par broyage mécanique dans le tampon de lyse avec les tubes Lysis Matrix (6910-500, MP Biomedicals) dans le FastPrep (MP Biomedicals, 116913500). Les extractions protéiques réalisées sur les coupes de cerveau et de moelle épinière de souris ont été effectuées avec le kit « Qproteome FFPE tissue kit » (Qiagen ; 37623) en suivant les instructions du fournisseur. Les extraits protéiques ont été dosés avec le kit BioRad (5000111, selon les instructions du fournisseur), entre 10 et 100 microgrammes d'extraits protéiques ont été déposés sur un gel de polyacrylamide à 10% Bis-Tris (BIO-RAD ; 3450111) ou à 12% Bis-Tris (BIO-RAD ; 3450117) selon la taille des protéines étudiées. La migration du gel a été effectuée dans une solution tampon XT-MOPS (BIO-RAD ; 1610788) à 150 mV pendant 3 heures. Les protéines ont été transférées sur une membrane en PVDF (Millipore, IPVH00010) ou en nitrocellulose (GE Healthcare, 10600002), selon la taille des protéines étudiées. Les différentes membranes ont été incubées avec les anticorps primaires suivants: anti-ubiquiline 2 de souris (1/1 000; H00029978-M03, Abnova), anti- α -tubuline de souris (1/10 000; T5168, Sigma), anti- α -actine de lapin (1/1 000; A2066, Sigma), anti-GFP de lapin (1/10 000 pour les cellules et 1/1 500 pour les tissus ; 6556, Abcam), anti-ubiquitine de lapin (1/200; Z0458, Dako), anti- α -spectrine de souris (pour les cellules NSC-34 ; 1/4 000 ; Millipore, MAB1622) ou anti- α -fodrine de lapin (pour les tissus humains ; 1/1 000 ;

NovusBiologicals, NBP1-53093). Les différentes membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires conjugués à la HPR (Horseradish Peroxydase) suivants : anti-souris (1/10 000; NA931V, GE Healthcare), anti-lapin (1/10 000; GE Healthcare, NA934V). Afin de révéler le signal, les membranes ont été incubées avec le kit ECL« Super signal West Dura Extended duration substrate » (Thermo Scientific). Les intensités des bandes de protéines ont été mesurées avec le logiciel Image J. Les intensités des bandes des protéines d'intérêt ont été normalisées à celles des protéines de ménage, puis les moyennes d'intensités ont été calculées pour chaque groupe et analysées statistiquement à l'aide du test de Student.

6.2 Co-immunoprécipitation

Les protéines ont tout d'abord été extraites à partir d'échantillons de moelle épinière avec le kit « Qproteome FFPE tissue kit » (Qiagen ; 37623) en suivant les instructions du fournisseur. L'immunoprécipitation de l'ubiquiline 2 a été réalisée selon le protocole du kit « Immunoprecipitation kit dynabeads protein G » (Life technologies, 10007D) avec un anticorps anti-ubiquilines 2 murine et humaine (1/1 000; H00029978-M03, Abnova) à partir d'un milligramme de lysat protéique. L'efficacité et la spécificité de l'immunoprécipitation de l'ubiquiline 2 a été vérifiée par western blot.

6.3 Spectrométrie de masse

Les complexes « bille + anticorps + protéines co-immunoprécipitées avec l'ubiquiline 2 » ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 4-12% (NuPAGE; Invitrogen) dans une solution tampon MOPS. Les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie et les bandes ont été coupées, traitées comme décrit par [Shevchenko et al. \(1996\)](#), puis digérées avec de la trypsine (Promega, V5111) pour être analysées par spectrométrie de masse hybride trappe d'ions-Orbitrap LTQ Orbitrap XL™ ETD (Thermo Scientific).

L'identification des protéines analysées par spectrométrie de masse a été faite à l'aide de la base de données « DAVID Bioinformatics Resources, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) ».

7 Analyses phénotypiques et comportementales

7.1 Survie et poids

Les souris ont été suivies quotidiennement et pesées une fois par semaine. Les analyses statistiques ont été réalisées sur les courbes de survie à l'aide du test du log-rank (Mantel-Cox) avec la moyenne de survie à l'aide du test ANOVA, post-test de Bonferroni (n=13 souris NI ou AAV10-Ub2Mut, n=18 souris AAV10-GFP et n=17 souris AAV10-Ub2), ainsi que sur les courbes de poids à l'aide du test ANOVA, post-test de Bonferroni (à 4, 8 et 12 semaines après l'injection des souris avec les AAVr) (n=16 souris non injectées, n=18 souris injectées avec l'AAV10-GFP et n=19 souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut).

7.2 Masse musculaire

Les *Tibialis anterior* (TA) prélevés sur les souris sacrifiées 2 mois après l'injection de vecteurs AAV10 ont été pesés. La masse du TA a été rapportée au poids des animaux et les analyses statistiques ont été réalisées avec le test ANOVA, post-test de Bonferroni (n=3 souris non injectées ou injectées avec l'AAV10-GFP et n=5 souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut).

7.3 Analyse des propriétés contractiles du muscle

La force maximale absolue, la force maximale spécifique et la capacité d'activation maximale ont été évaluées en mesurant la contraction musculaire isométrique *in situ* des muscles *Tibialis anterior* (TA) en réponse à une stimulation nerveuse (comme l'ont décrit [Mouisel et al., 2006](#)). Les souris âgées de 2 mois ont été anesthésiées par administration intrapéritonéale d'une solution de pentobarbital (60 mg/kg). Le genou et le pied ont été fixés avec des pinces et des épingles en acier inoxydable, et le tendon distal du TA a été attaché à un transducteur isométrique (Aurora Scientific) à l'aide d'une ligature en soie, sous tension constante. Les réponses de force à la stimulation électrique des muscles et des nerfs (impulsions d'onde carrée de 0,1 ms, fréquence d'impulsion de 75 à 150 Hz et train de stimulation de 500 ms) ont été successivement enregistrées. La force isométrique maximale absolue (exprimée en Newton ou N) a été déterminée à une longueur optimale (longueur à laquelle la tension maximale a été obtenue pendant la tétanie) et ensuite normalisée à la masse musculaire pour estimer la force maximale spécifique (ou force tétanique exprimée en N/g). La moyenne de la force tétanique a été déterminée pour chaque groupe et les analyses statistiques ont été faites avec le test ANOVA, post-test de Bonferroni (n=6 souris non injectées, n=9 souris injectées l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut).

7.4 Test d'agrippement

Après une période d'adaptation de 2 semaines, la force musculaire de la souris a été évaluée par le test d'agrippement (Bioseb GS3, France) 1 mois après les injections d'AAVr. La force d'agrippement a été mesurée en posant, puis en retirant, la souris de la grille métallique de l'appareil, reliée à un capteur (enregistrant la force en gramme) (**figure 23**). Cinq enregistrements ont été réalisés par souris. Le score le plus bas et le score le plus élevé n'ont pas été pris en compte dans la moyenne de force d'agrippement. La force moyenne d'agrippement a été normalisée au poids de l'animal et les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test ANOVA, post-test de Bonferroni (n=11 souris non injectées, n=6 souris injectées avec l'AAV10-GFP, n=10 souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et n=9 souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut).



Figure 23 : Test d'agrippement.

7.5 Analyse de la marche (footprint test)

Les changements dans la coordination et l'équilibre moteur ont été évalués grâce à l'analyse des empreintes de pas. Les pattes avant et arrière des animaux âgés de 2 mois ont été trempées dans de la peinture rouge et bleue, respectivement. Chaque souris a été placée sur un couloir (50 cm de long sur 10 cm de large) le long duquel elle a été contrainte d'avancer, laissant ses empreintes sur un papier blanc (**figure 24**). La longueur des pas et de leur chevauchement ont été mesurés sur trois pas par souris et les moyennes ont été calculées pour chaque groupe. Les analyses statistiques de ces moyennes ont été faites avec le test de Student (n=8 souris non injectées, n=6 souris injectées avec l'AAV10-GFP ou l'AAV10-Ub2 et n=4 souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut).

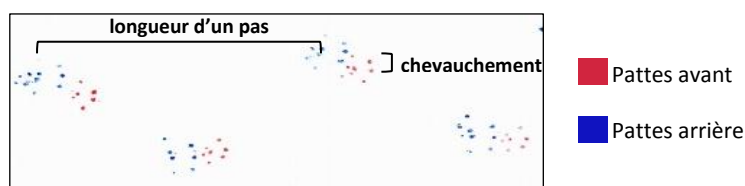


Figure 24: Principe de mesure de la longueur et du chevauchement des pas à partir des empreintes de souris.

7.6 Test d'anxiété clair/obscur

Les comportements d'anxiété ont été évalués à l'aide du test d'anxiété clair/obscur (Bioseb, LE810 ; **figure 25**) sur des souris âgées de 6 semaines. Ce dispositif se présente de la façon suivante: un compartiment obscur qui communique avec un compartiment éclairé par une ampoule de 800 lux.

Avant chaque expérience, les souris ont été isolées dans une cage pendant 30 minutes comme période d'adaptation avant l'exécution du test, afin qu'elles s'habituent à l'éclairage. Elles ont ensuite été placées dans le compartiment obscur. Sur une durée de 5 minutes, les paramètres suivants ont été enregistrés pour chaque animal :

- 1) le temps total dans le compartiment éclairé (en secondes);
- 2) le temps total dans le compartiment obscur (en secondes);
- 3) le temps de latence (temps mis avant la première entrée dans le compartiment éclairé, en secondes);
- 4) le nombre d'entrées dans le compartiment obscur ;
- 5) le nombre d'hésitations entre un compartiment et l'autre.

Pour chacun de ces paramètres, la moyenne a été calculée pour chaque groupe et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test ANOVA, post-test de Bonferroni (n=11).

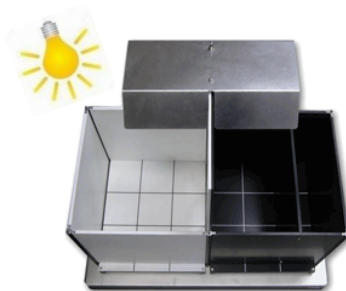


Figure 25 : Cage utilisée pour le test d'anxiété clair/obscur.

7.7 Phénotypes de "claspings" et "spinning" (test de suspension par la queue)

La recherche de signes neurologiques a été effectuée 3, 6 et 9 semaines après l'injection des animaux avec les AAVr. Pour cela, les souris ont été suspendues par la queue pendant 30 secondes environ afin de déterminer la présence de « claspings » (rétraction des pattes arrière). En fonction du phénotype observé, un score a été attribué à chaque animal de la façon suivante :

- 0 : pas de « claspings »
- 1 : « claspings » rapide et transitoire seulement après stimulation;
- 2 : « claspings » persistant des membres postérieurs après stimulation;
- 3 : « claspings » spontané des membres postérieurs sans stimulation;

4 : « clasping » spontané des membres postérieurs et antérieurs;

5 : « clasping » persistant des membres postérieurs ou antérieurs pendant plus de 5 secondes après que les souris aient été replacées dans leur cage (Liu *et al.*, 2011).

Pendant l'exécution du test de suspension par la queue un phénomène de « spinning » a été observé; c'est-à-dire une rotation très rapide des souris sur elles-mêmes. Le pourcentage de souris présentant un « clasping » ou un « spinning » a été déterminé pour chaque groupe et les analyses statistiques ont été faites avec le test ANOVA, post-test de Bonferroni et le test de Student respectivement (n=22 souris non injectées ou injectées avec l'AAV10-GFP, n=19 souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut).

8 Tissus humains

Des échantillons de cortex et de moelle épinière (conservés à -80°C), prélevés sur des individus sains (témoins) et sur des patients atteints de SLA sporadiques (**tableau 6**), ont été fournis par la plateforme de ressources biologiques GIE Neuro-CEB (dirigée par le Pr Danielle SEILHEAN, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière).

Tableau 6 : Caractéristiques des individus contrôles (témoin) et des patients atteints de SLA sporadiques.

Nom	N°	Sexe	Age	Diagnostic	Tissus
SLA1	A1102033	M	78	SLA sporadique	Cortex F2 et moelle cervicale
SLA2	A1100494	F	83	SLA sporadique	Cortex F2 et moelle cervicale
SLA3	A100928	M	41	SLA sporadique	Cortex F2 et moelle cervicale
CTL1	A1400019	F	53	Témoin	Cortex F2 et moelle cervicale
CTL2	A0800402	F	93	Témoin	Cortex F2 et moelle cervicale
CTL3	A1101620	M	72	Témoin	Cortex F2 et moelle cervicale

9 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les courbes de survie ont été analysées avec le test du log-rank Mantel-Cox; la significativité statistique entre les différentes conditions a été analysée avec le test de Student ou ANOVA (post-test de Bonferroni) selon les expériences.

RESULTATS

1 Génération d'un modèle murin de la SLA-UBQLN2 par surexpression de l'ubiquiline 2 humaine mutée

1.1 L'expression de l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée *in vitro* conduit à la formation d'agrégats

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'expression des séquences d'ADNc codant la forme sauvage et la forme mutée (mutation P497H appelée ubiquiline 2^{P497H}) de l'ubiquiline 2 humaine. La SLA se caractérise principalement par la mort des MNs et de la présence d'ubiquiline 2 dans les inclusions protéiques observées dans les MNs et le cerveau (Deng *et al.*, 2011). Par conséquent, nous avons vérifié l'expression des formes sauvage et mutée de l'ubiquiline 2 humaine dans une lignée de MNs murins, les NSC-34 (Neuroblastoma x spinal cord cells) ainsi que dans une lignée de neurones murins, les Neuro2a (Neuroblastoma). Pour cela, nous avons inséré la séquence d'ADNc sauvage ou mutée de l'ubiquiline 2 humaine dans un plasmide d'expression (pcDNA™3.1/*myc*-His). Nous avons transfecté les cellules NSC-34 et Neuro2a avec les plasmides renfermant la séquence sauvage ou mutée de l'ubiquiline 2 humaine (plasmides pcDNA-Ub2 et pcDNA-Ub2Mut, respectivement). 72h après la transfection, nous avons vérifié l'expression de la protéine par immunofluorescence.

Nous avons observé au microscope confocal (**figure 26**), un marquage rouge cytoplasmique très intense avec des agrégats localisés dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules transfectées, en revanche, nous avons détecté qu'un léger marquage rouge cytoplasmique des cellules non transfectées exprimant uniquement l'ubiquiline 2 endogène. Toutefois, aucune différence du nombre, de la taille et de la localisation des agrégats n'a été constatée entre les cellules transfectées avec l'ubiquiline 2 sauvage et l'ubiquiline 2 mutée.

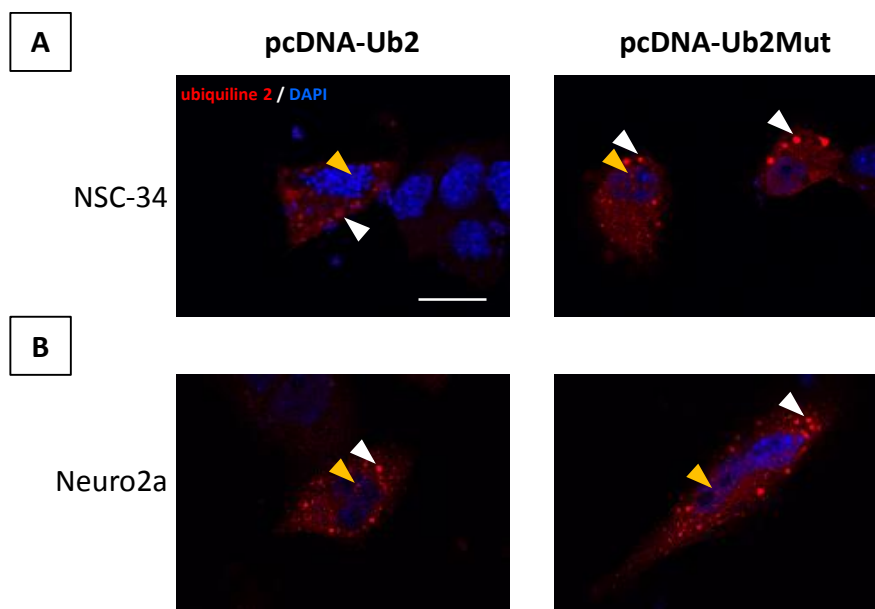


Figure 26 : Expression et localisation de l'ubiquiline 2 dans les cellules NSC-34 et Neuro2a transfectées avec les plasmides pcDNA-Ub2 et pcDNA-Ub2Mut.

Analyses par immunofluorescence avec un anticorps primaire reconnaissant les formes humaine et murine de l'ubiquiline 2, 72h après la transfection des cellules NSC-34 (A) et Neuro2a (B). Marquage de l'ubiquiline 2 en rouge et marquage des noyaux en bleu (au DAPI). Les cellules transfectées avec le plasmide pcDNA-Ub2 ou le plasmide pcDNA-Ub2Mut sont visibles par la formation d'inclusions protéiques positives pour l'ubiquiline 2 qui sont principalement localisées dans le cytoplasme (indiquées par les flèches blanches) et dans le noyau (indiquées par les flèches jaunes). Photos représentatives de trois expériences de transfection indépendantes prises au microscope confocal (barre d'échelle: 100 μ m).

L'expression de l'ubiquiline 2 humaine a également été vérifiée par western blot, 48h après la transfection des cellules NSC-34 avec le plasmide pcDNA-Ub2 ou le plasmide pcDNA-Ub2Mut (figure 27). Les cellules NSC-34 transfectées avec un plasmide renfermant la séquence codante de la Green Fluorescent Protein (GFP), ont servi de contrôle négatif. Ces cellules transfectées uniquement avec le plasmide GFP ont exprimé la GFP (27 kDa) ainsi que l'ubiquiline 2 murine (deux bandes autour de 70kDa) marquée par un anticorps reconnaissant l'ubiquiline 2 murine et l'ubiquiline 2 humaine. En revanche, les cellules transfectées avec le plasmide pcDNA-Ub2 ou le plasmide pcDNA-Ub2Mut ont exprimé, en plus de l'ubiquiline 2 murine, la forme humaine de la protéine, représentée par une seule bande d'environ 70kDa.

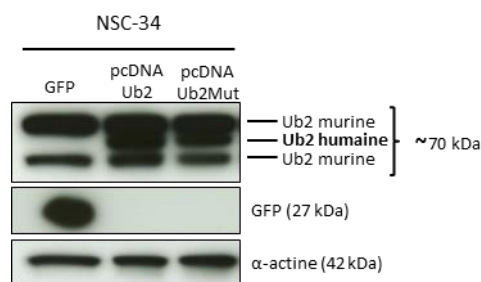


Figure 27: Expression de l'ubiquiline 2 humaine 48h après la transfection des cellules NSC-34 avec les plasmides pcDNA-Ub2 et pcDNA-Ub2Mut.

Analyses par western blot montrant l'expression de l'ubiquiline 2 murine et humaine dans les cellules NSC-34 transfectées avec les plasmides GFP, pcDNA-Ub2 ou pcDNA-Ub2Mut. Les NSC-34 transfectées avec le plasmide GFP expriment uniquement la protéine endogène (ubiquiline 2 murine), représentée par deux bandes autour de 70kDa, ainsi que la GFP (27kDa). L'ubiquiline 2 humaine, représentée par la bande située entre les deux bandes correspondant à l'ubiquiline 2 murine, est exprimée uniquement dans les cellules transfectées avec les plasmides pcDNA-Ub2 ou pcDNA-Ub2Mut. L'α-actine a été utilisée comme gène de ménage. kDa: kiloDalton. Les résultats montrés ici sont représentatifs de deux expériences de transfection indépendantes.

Ces premiers résultats ont montré que les plasmides pcDNA-Ub2 et pcDNA-Ub2Mut permettent l'expression de l'ubiquiline 2 humaine (sauvage ou mutée) dans les neurones et les MNs de souris. De plus, nous avons montré que l'expression de ces protéines dans des cellules NSC-34 et Neuro2a conduit à la formation d'agrégats nucléaires et cytoplasmiques. Nous avons donc décidé d'exprimer les séquences humaines d'ubiquiline 2 sauvage ou mutée *in vivo* via les vecteurs AAV.

1.2 La transfection des plasmides AAV-Ub2 ou AAV-Ub2Mut dans les cellules NSC-34 conduit à l'expression de l'ubiquiline 2 humaine

Afin de produire des vecteurs AAV, nous avons construit des plasmides portant soit la séquence d'ADNc humaine de l'ubiquiline 2 sauvage ou de l'ubiquiline 2 mutée (nommés respectivement AAV-Ub2 ou AAV-Ub2Mut), soit la séquence d'ADN codant pour la GFP (plasmide contrôle) entre les ITRs du génome viral (**figure 28**). Pour transduire efficacement les cellules du SNC, les vecteurs AAVdb sont les plus utilisés car ils permettent une expression plus rapide du transgène (suppression de l'étape de synthèse du deuxième brin de l'ADN) et une meilleure efficacité de transduction (McCarty *et al.*, 2003 ; Duqué *et al.*, 2009 ; Foust *et al.*, 2009). Toutefois, la taille du génome des AAVdb est de 2,3 kb, ce qui restreint la capacité de clonage aux séquences d'ADN de petite taille (Le Bec *et Douar*, 2006). La taille de l'ADNc codant pour l'ubiquiline 2 humaine faisant 1,8 kb, nous avons donc été contraints d'utiliser un AAVsb. Pour diriger l'expression de l'ADNc de l'ubiquiline 2 humaine (sauvage ou mutée) ou la séquence d'ADN codant pour la GFP, nous avons utilisé le promoteur ubiquitaire de la PhosphoGlycérate Kinase (PGK). Pour augmenter la quantité de protéines produites, nous avons également ajouté un intron

chimérique de la β -globine en amont des gènes et une séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element) en aval des gènes (Loeb *et al.*, 1999).

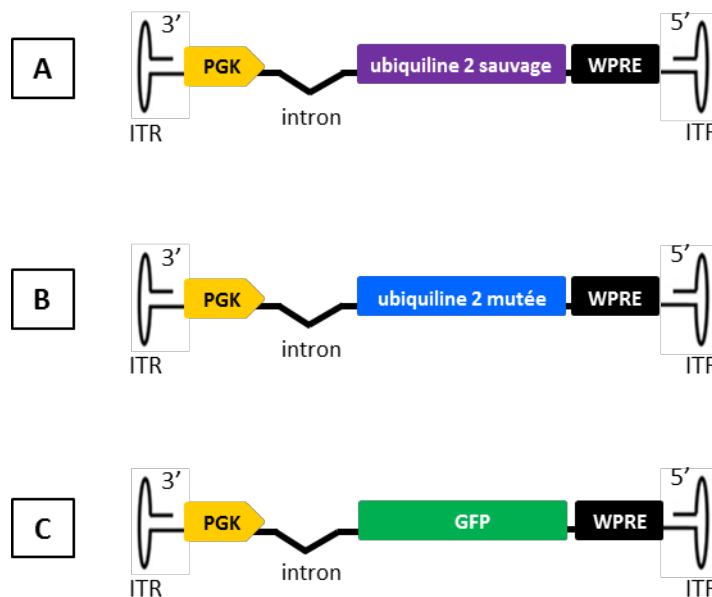


Figure 28: Représentation schématisée des plasmides AAV-GFP, AAV-Ub2 et AAV-Ub2Mut.

L'ADNc de l'ubiquiline 2 humaine sauvage (A) ou mutée (B) a été inséré sous le contrôle du promoteur ubiquitaire PGK et cloné entre les ITR du génome AAVsb. Un plasmide AAVsb codant pour la GFP a également été produit comme contrôle (C). ITR: Inverted Terminal Repeats; PGK: PhosphoGlycerate Kinase; intron: intron chimérique de la β -globine de poulet; WPRE: Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element.

L'expression de l'ubiquiline 2 humaine a ensuite été vérifiée par western blot, 48h après la transfection des cellules NSC-34 avec les plasmides AAV-Ub2 et AAV-Ub2Mut (figure 29).

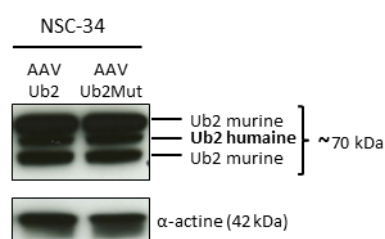


Figure 29: Expression de l'ubiquiline 2 humaine suite à la transfection des cellules NSC-34 avec les plasmides AAV-Ub2 et AAV-Ub2Mut.

Analyse par western blot de l'expression des ubiquilines 2 murine et humaine, 48 h après la transfection des cellules NSC-34 avec les plasmides AAV-Ub2 et AAV-Ub2Mut. La bande correspondant à la forme humaine de l'ubiquiline 2 (d'environ 70kDa), en plus de celles correspondant à la protéine endogène, a été observée dans les deux conditions de transfection. L' α -actine a été utilisée comme gène de ménage. kDa: kiloDalton.

1.3 Production et injection des vecteurs AAV10 dans les ventricules cérébraux de souris nouveau-nées sauvages pour la génération du modèle animal

Pour générer notre modèle animal, nous avons utilisé des vecteurs AAV de sérotype 10 qui présentent une importante capacité de transduction des cellules du SNC (étude réalisée au sein de notre équipe), en particuliers dans l'hippocampe, le cortex et la moelle épinière après une simple injection intraveineuse (IV) chez les souris nouveau-nées (Tanguy *et al.*, 2015). Nous avons ainsi produit des vecteurs AAV10 recombinants qui renferment la séquence d'ADNc humain de l'ubiquiline 2^{P497H} (AAV10-Ub2Mut) ou la séquence d'ADNc humain de l'ubiquiline 2 sauvage (AAV10-Ub2) dans des cellules HEK293T. D'autres vecteurs portant la séquence codante de la GFP (AAV10-GFP) ont également été produits.

Ces vecteurs ont ensuite été administrés par des injections Intra Cérébro Ventriculaires (ICV) dans des souris nouveau-nées sauvages (FVB) à J0 et J1 ($5 \cdot 10^{13}$ vg/kg au total par souris). Nous avons choisi d'injecter les vecteurs viraux par voie ICV afin d'avoir une meilleure efficacité de transduction des cellules du SNC et des organes périphériques par rapport à l'injection en intraveineuse (Meyer *et al.*, 2015 ; Armbruster *et al.*, 2016) (figure 30).

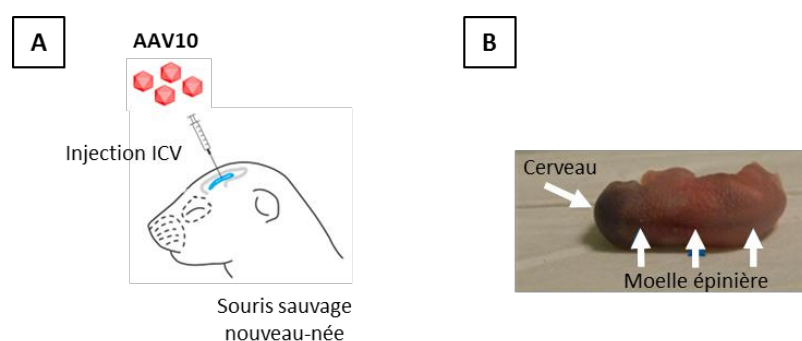


Figure 30: Représentation schématisée de l'injection en ICV des AAV10 chez les souris sauvages nouveau-nées.

(A) Pour générer le modèle animal, les souris ont reçu une première injection d'AAV10 dans le ventricule cérébral droit à la naissance (jour 0) puis une deuxième injection dans le ventricule gauche le lendemain (jour 1). La dose totale de vecteurs injectés est de $7 \cdot 10^{10}$ génomes viraux par souris. **(B)** Photographie d'un souriceau injecté avec du bleu trypan dans les ventricules latéraux du cerveau. Dès quelques secondes après l'injection, le bleu diffuse dans le cerveau et la moelle épinière. ICV: Intra Cérébro Ventriculaire.

1.4 L'injection de l'AAV10-GFP par voie ICV permet l'expression de la GFP dans le SNC et le muscle squelettique des souris sauvages

Un mois après l'injection des souris avec l'AAV10-GFP, nous avons vérifié l'expression de la GFP qui a été observée dans les cellules localisées dans différentes régions du cerveau (cortex, hippocampe et cervelet), dans la moelle épinière et le *triceps* (**figure 31**). Ces observations montrent donc que l'injection ICV de ce vecteur AAV10 simple brin permet l'expression du transgène dans les cellules du SNC et du muscle squelettique.

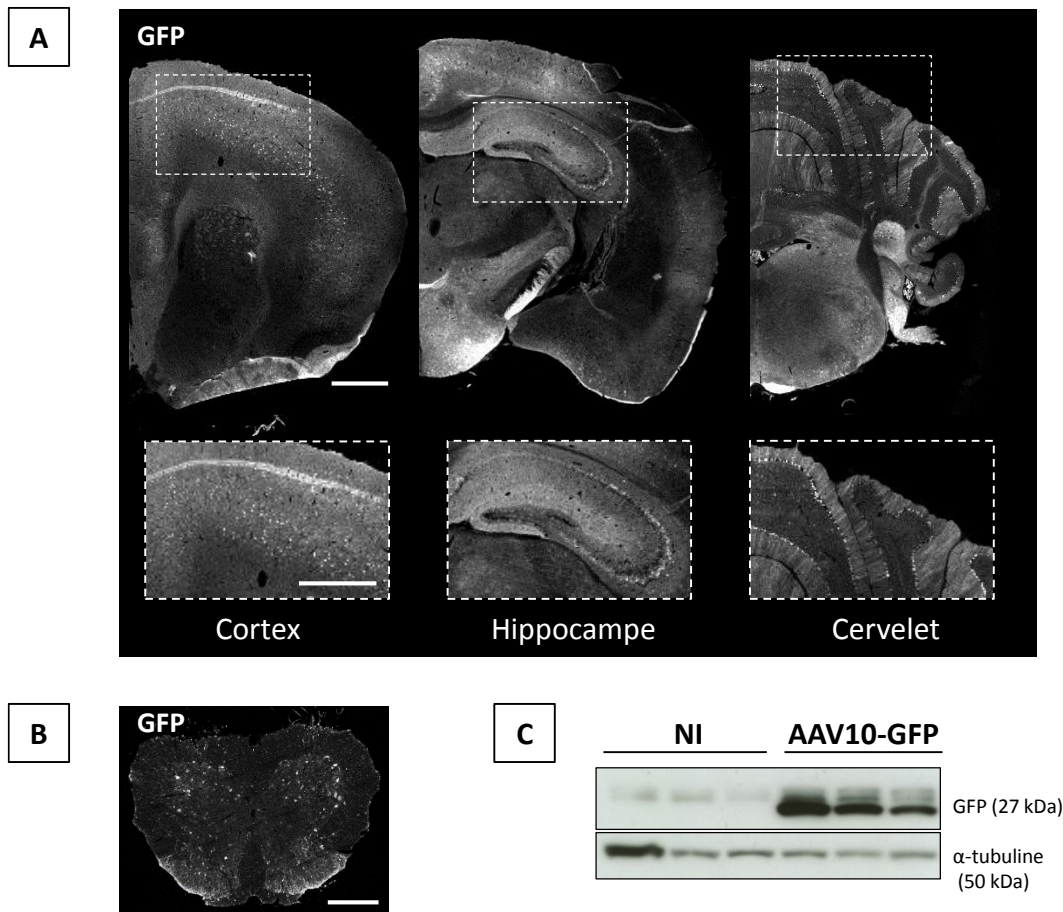


Figure 31: Expression de la GFP dans le cerveau, la moelle épinière et le muscle squelettique chez les souris injectées avec l'AAV10-GFP par voie ICV.

(A) Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps anti-GFP, sur des coupes de cerveau un mois après l'injection des souris sauvages FVB (n=6) avec l'AAV10-GFP par voie ICV. Les cellules localisées notamment dans le cortex, dans l'hippocampe et dans le cervelet expriment la GFP. Ces régions sont mises en évidence par un cadre blanc en pointillé sur les images de sections de cerveau (photographies du haut) avec leur agrandissement (photographies du bas). **(B)** Analyses d'immunofluorescence de la GFP sur des coupes de moelle épinière (région lombaire) provenant de la même souris qu'en A. Le signal positif pour la GFP est visible dans la substance blanche et la substance grise. Les cellules situées dans les cornes ventrales de la moelle épinière, où sont localisés les MNs, expriment également la GFP. **(C)** Analyses par western blot réalisées sur des extraits protéiques de *triceps* prélevés un mois après l'injection ICV des souris sauvages nouveau-nées avec l'AAV10-GFP, comparées à des souris non injectées (n=3 par condition). Ces analyses montrent que la GFP s'exprime aussi dans les muscles squelettiques. Images représentatives, prises au microscope à fluorescence (barres d'échelle : 1 mm pour le cerveau et 200 μ m pour la moelle épinière).

2 Caractérisation physiopathologique du modèle murin de la SLA-UBQLN2

Afin de générer le modèle animal et d'effectuer sa caractérisation physiopathologique, nous avons injecté trois groupes d'animaux : un groupe avec l'AAV10-Ub2Mut, un groupe avec l'AAV10-Ub2 et un groupe avec l'AAV10-GFP (**figure 32**). Nous avons aussi utilisé un quatrième groupe de souris non injectées comme souris contrôles.

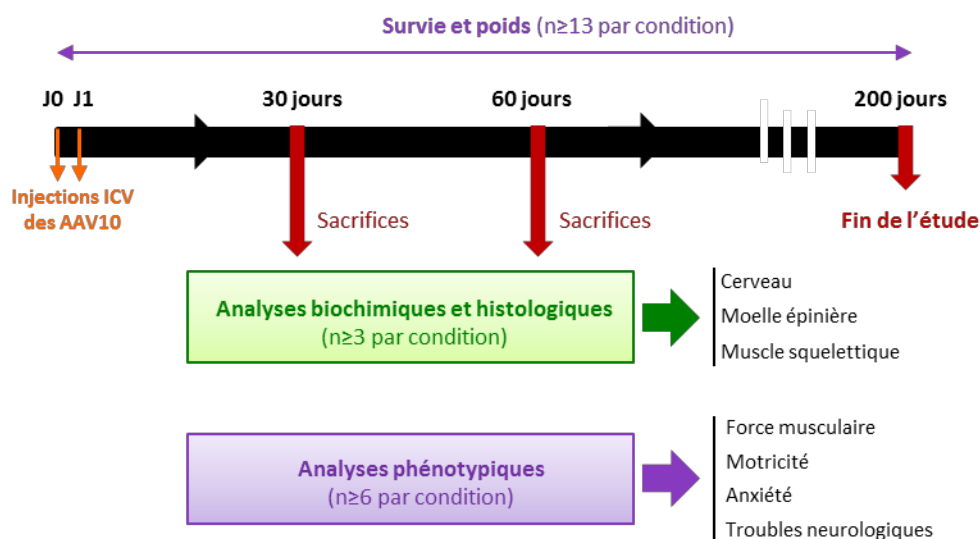


Figure 32: Représentation schématisée du protocole mis en place pour la caractérisation du modèle animal.

Pour la caractérisation du modèle, les souris sauvages ont reçu une injection ICV de vecteurs viraux (AAV10-GFP, AAV10-Ub2 ou AAV10-Ub2Mut) à la naissance (J0) et à un jour (J1), et ont été comparées à des souris non injectées. Un groupe de souris a été suivi pour déterminer la survie et l'évolution du poids. Un et deux mois après l'injection, des souris ont été sacrifiées pour effectuer les analyses biochimiques et histologiques sur différents tissus (cerveau, moelle épinière et muscle squelettique). D'autres souris ont été soumises à des analyses phénotypiques pour vérifier la présence d'altérations de la force musculaire et de la motricité, de signes d'anxiété et de troubles neurologiques. L'étude de la survie a été arrêtée 200 jours après l'injection. Le nombre de souris utilisées pour chaque analyse est indiqué dans le schéma.

Au niveau histologique, la SLA accompagnée de démences se caractérise par une atrophie du cerveau, une perte de MNs et une astrogliose dans la moelle épinière ainsi qu'une atrophie musculaire (Deng et al., 2011 ; Gordon et al., 2013). Nous avons donc effectué des **analyses histologiques** sur des coupes de cerveau, de moelle épinière et de muscle de souris sacrifiées un et deux mois après l'injection des vecteurs AAV10, dans le but de vérifier si notre modèle présentait également ces caractéristiques (**figure 32**).

Au niveau phénotypique, elle se caractérise par une faiblesse musculaire et des troubles moteurs et comportementaux (anxiété et démence, notamment) (Deng et al., 2011 ; Gordon et al., 2013). Nous avons donc réalisé des **analyses phénotypiques et comportementales**, un et deux mois après l'injection des vecteurs AAV10, afin de vérifier si notre modèle présentait également

ces phénotypes pathologiques (**figure 32**). De plus, un groupe de souris a été suivi jusqu'à 200 jours après l'injection d'AAV10, pour réaliser les analyses de survie et de poids (**figure 32**).

2.1 L'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit l'expression de l'ubiquiline 2 dans le cerveau et la moelle épinière des souris sauvages

Tout d'abord, nous avons vérifié l'expression de l'ubiquiline 2 humaine par western blot dans le cerveau et la moelle épinière des souris injectées avec les vecteurs AAV10-GFP, AAV10-Ub2 et AAV10-Ub2Mut, un et deux mois après l'injection (**figure 33**). Nous avons seulement observé l'expression de l'ubiquiline 2 endogène murine chez les souris non injectées et les souris injectées avec l'AAV10-GFP. Les animaux injectés avec les vecteurs AAV10-Ub2 ou AAV10-Ub2Mut expriment la forme humaine de l'ubiquiline 2 qui est représentée par une bande d'environ 70 kDa, comme observé pour les cellules NSC-34 transfectées avec le plasmide AAV10-Ub2 (contrôle positif).

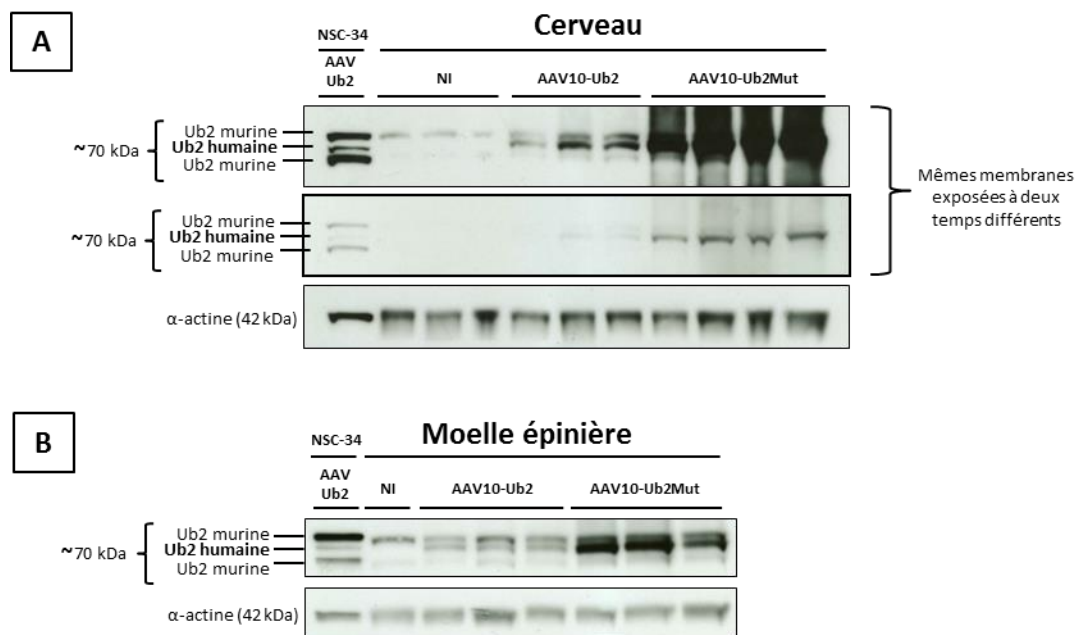


Figure 33: Expression de l'ubiquiline 2 humaine dans la moelle épinière et le cerveau des souris injectées avec les vecteurs AAV10-Ub2 ou AAV10-Ub2Mut.

Analyses par western blot réalisées sur des extraits protéiques de cerveau (**A**) et de moelle épinière (**B**) de souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées. Cette analyse a été effectuée sur 12 souris par condition, un mois (n=3 par condition) et deux mois (n=3 par condition) après l'injection. Les résultats montrés sur cette figure sont représentatifs et ont été obtenus à partir d'extraits protéiques de souris sacrifiées deux mois après l'injection. Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et l'AAV10-Ub2Mut expriment l'ubiquiline 2 humaine, contrairement aux souris non injectées (NI) qui expriment uniquement la forme murine. L'analyse sur les extraits protéiques provenant des cellules NSC-34 transfectées avec le plasmide AAV-Ub2 est montrée comme contrôle positif. L' α -actine a été utilisée comme gène de ménage. Un groupe de 6 souris a été injecté avec l'AAV10-GFP et analysé un mois (n=3) et deux mois après l'injection (n=3). Comme pour les souris non injectées, ces souris expriment exclusivement la forme murine de l'ubiquiline 2 (résultats non montrés). kDa: kiloDalton.

Bien que la même quantité de vecteurs ait été injectée, l'analyse par western blot a montré des niveaux d'expression différents entre l'ubiquiline 2 humaine mutée et l'ubiquiline 2 humaine sauvage. Nous avons donc quantifié le niveau d'expression de deux protéines suite à l'injection des AAV10. Cette analyse a montré que la quantité d'ubiquiline 2 humaine mutée est supérieure de 28,2% dans le cerveau et de 17,4% dans la moelle épinière des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut par rapport à la quantité d'ubiquiline 2 humaine sauvage chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2. Cette différence suggère une accumulation de la protéine mutée, pouvant s'expliquer par une réplication de la protéine de type prion.

2.2 L'injection d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV réduit la durée de vie et le poids des souris sauvages

Nous avons également réalisé des analyses phénotypiques comme l'étude de la survie et le suivi de prise de poids (**figure 34**). Les souris surexprimant l'ubiquiline 2 mutée ont survécu moins longtemps (moyenne de survie en jours : $76,38 \pm 8,51j$) que les souris non injectées ($184,5 \pm 10,48j$; $P < 0,0001$), que les souris injectées avec l'AAV10-GFP ($180,2 \pm 13,61j$; $P < 0,0001$) et que les souris surexprimant l'ubiquiline 2 sauvage ($154,7 \pm 17,70j$; $P < 0,01$) (**figure 34 : A et B**). Nous n'avons pas observé de différence significative entre les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et les souris contrôles (non injectées ou injectées avec l'AAV10-GFP). Aucune différence significative n'a été observée entre les souris injectées avec l'AAV10-GFP et les souris non injectées. La médiane de survie des souris surexprimant l'ubiquiline 2 mutée a été raccourcie à 80 jours (**figure 34 : B**).

De plus, leur poids a été divisé par deux (poids moyens en grammes : $7,63 \pm 0,42g$) comparé aux souris non injectées ($16,27 \pm 0,61g$; $P < 0,0001$) et aux souris injectées avec l'AAV10-GFP ($17,18 \pm 0,42g$; $P < 0,0001$) à l'âge d'un mois (**figure 34 : C**). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ont également présenté un poids inférieur ($10,08 \pm 0,45g$), d'environ un tiers, comparé à celui des souris non injectées ($16,26 \pm 0,61g$; $P < 0,0001$) et des souris injectées avec l'AAV10-GFP ($17,18 \pm 0,42g$; $P < 0,0001$). A l'âge de deux mois, les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut ont montré un poids significativement inférieur ($15,00 \pm 0,92g$) à celui des souris non injectées ($23,78 \pm 0,53g$; $P < 0,0001$), des souris injectées avec l'AAV10-GFP ($22,08 \pm 1,04g$; $P < 0,0001$) et de celles injectées avec l'AAV10-Ub2 ($20,33 \pm 0,63g$; $P < 0,0001$). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ont montré une diminution de leur poids par rapport à celui des souris non injectées uniquement ($23,78 \pm 0,53g$; $P < 0,05$). Nous n'avons pas observé de différence entre le poids des souris non injectées et celui des souris injectées avec l'AAV10-GFP.

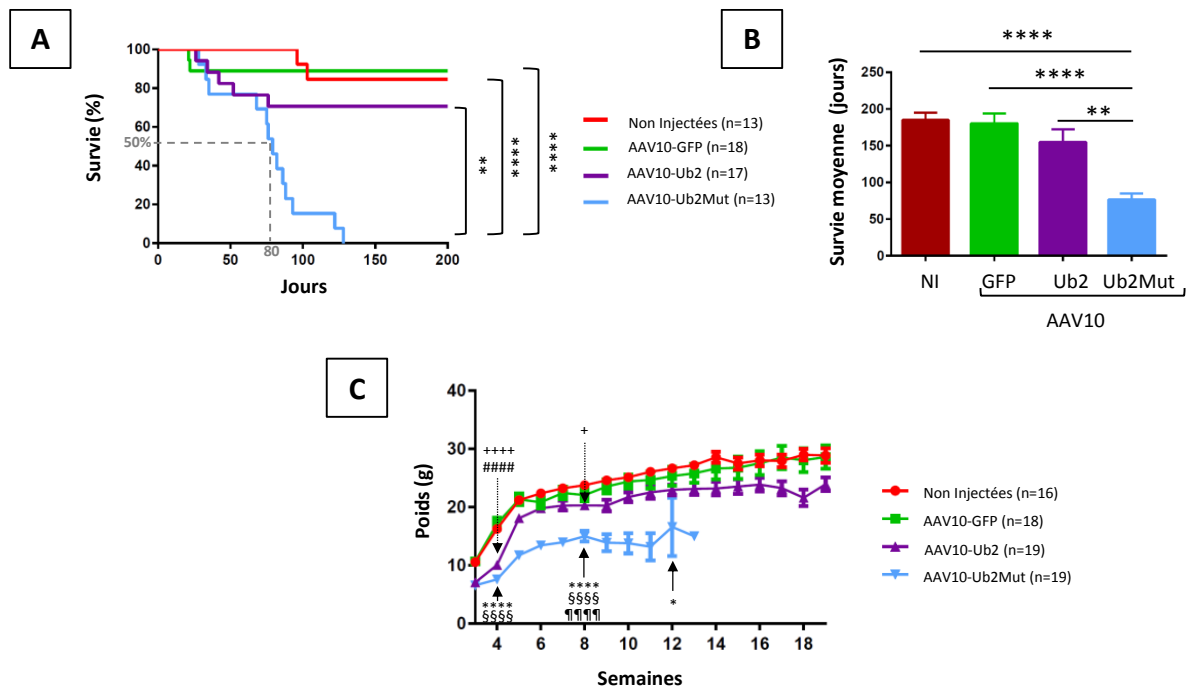


Figure 34: Réduction de la survie et du poids chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine mutée.

Analyses du pourcentage de survie **(A)** et de la moyenne de survie **(B)** jusqu'à 200 jours après l'injection avec l'AAV10-GFP (vert, n=18), l'AAV10-Ub2 (violet, n=17) ou l'AAV10-Ub2Mut (bleu, n=13) qui sont comparées aux souris non injectées (rouge, n=13). **(A)** L'analyse des courbes de survie à l'aide du test du log-rank Mantel-Cox montre une réduction significative de la survie des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut par rapport aux souris non injectées (**** P<0,0001) et les souris injectées avec l'AAV10-GFP (**** P<0,0001) ou l'AAV10-Ub2 (** P<0,01). Aucune différence significative n'est observée entre les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, l'AAV10-GFP et les souris non injectées. **(B)** La moyenne de survie des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut est significativement réduite par rapport aux animaux non injectés (**** P<0,0001) et injectés avec l'AAV10-GFP (**** P<0,0001) ou l'AAV10-Ub2 (** P<0,01). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM et analysés par ANOVA, post-test de Bonferroni. **(C)** Analyses du poids jusqu'à 200 jours après l'injection des souris avec l'AAV10-GFP (vert, n=18), l'AAV10-Ub2 (violet, n=19) ou l'AAV10-Ub2Mut (bleu, n=19) comparées aux souris non injectées (rouge, n=16). Le poids des souris injectées avec l'AAV10-Ub2 est significativement réduit par rapport à celui des souris non injectées à quatre et huit semaines (++++ P<0,0001 et + P<0,05, respectivement) et des souris injectées avec l'AAV10-GFP à quatre semaines (##### P<0,0001). Le poids des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut est également réduit par rapport à celui des souris non injectées à quatre et huit semaines (**** P<0,0001, dans les deux cas) et à douze semaines (* P<0,05), ainsi que par rapport aux souris injectées avec l'AAV10-GFP à quatre et huit semaines (§§§§ P<0,0001, dans les deux cas). Il est également significativement réduit chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut par rapport à celles injectées avec l'AAV10-Ub2 à huit semaines (¶¶¶¶ P<0,0001). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM et analysés par ANOVA, post-test de Bonferroni à quatre, huit et douze semaines.

La surexpression de l'ubiquiline 2 mutée induit donc la mort prématurée des souris sauvages et impacte leur croissance, alors que la surexpression de la forme sauvage de la protéine ne réduit pas leur durée de vie, mais a néanmoins un effet sur leur poids un mois après l'injection.

En absence de signe pathologique évident et de perte de poids, nous avons décidé d'interrompre le suivi des souris contrôles et des souris surexprimant l'ubiquiline 2 sauvage sept mois après l'injection ; ceci bien après avoir observé la mort de toutes les souris surexprimant l'ubiquiline 2 mutée.

2.3 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit la formation d'agrégats dans le cerveau et la moelle épinière des souris sauvages

Nous avons ensuite analysé par immunofluorescence, l'expression de l'ubiquiline 2 dans le cerveau et la moelle épinière des souris non injectées, injectées avec l'AAV10-GFP, l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut, un et deux mois après l'injection. Pour les souris non injectées ou injectées avec l'AAV10-GFP, nous avons détecté un faible marquage dans le cytoplasme des cellules du **cortex moteur** et de **l'hippocampe** (gyrus denté et CA3) dû à l'expression de la protéine endogène (**figure 35**). Nous avons observé la présence de petits agrégats cytoplasmiques et parfois nucléaires chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2. Après l'injection d'AAV10-Ub2Mut, nous avons observé la présence de nombreux agrégats de grande taille (inclusions) positifs pour l'ubiquiline 2. Dans **le cervelet** des souris injectées avec l'AAV10-Ub2, nous avons détecté une forte expression diffuse dans le cytoplasme des cellules de Purkinje ainsi que des agrégats localisés dans la couche moléculaire (**figure 36 : A**). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut ont présenté des inclusions dans la couche moléculaire et plus spécifiquement une forte expression de l'ubiquiline 2 dans les dendrites des cellules de Purkinje (**figure 36 : B**).

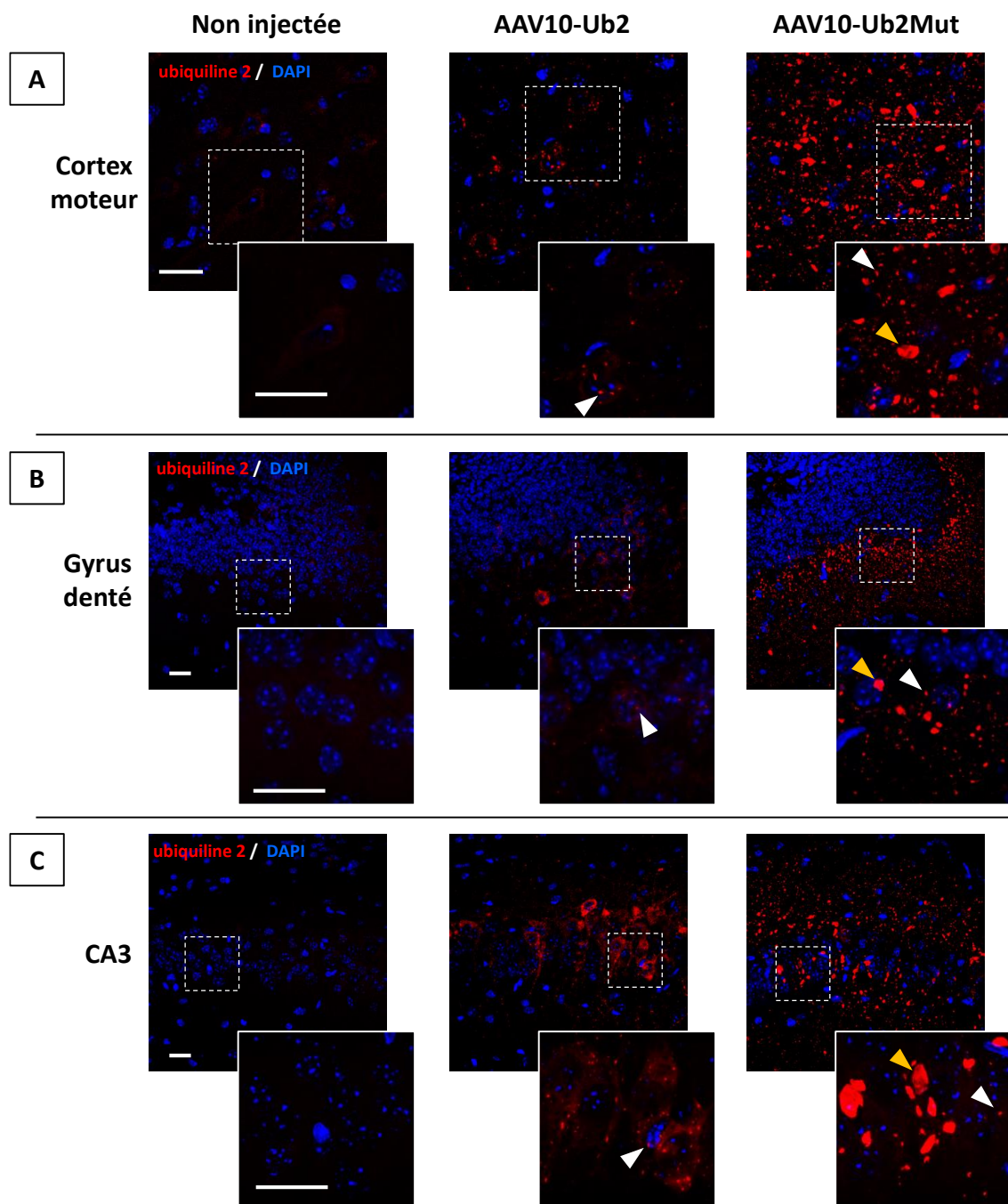


Figure 35: Présence d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 dans le cortex moteur et l'hippocampe des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps primaire reconnaissant la forme humaine et murine de l'ubiquiline 2, sur des coupes de cerveau: cortex moteur **(A)**, gyrus denté de l'hippocampe **(B)** et la région CA3 de l'hippocampe **(C)** de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées (n=6 par condition). Les souris non injectées expriment l'ubiquiline 2 endogène, visible par un léger marquage rouge cytoplasmique. Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 présentent l'expression de l'ubiquiline 2 humaine (marquage rouge intense) dans les cellules neuronales du cortex moteur **(A)** et de l'hippocampe **(B et C)** avec de petits agrégats cytoplasmiques et parfois nucléaires (indiqués par les flèches blanches). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut présentent de nombreux agrégats et inclusions (indiquées par les flèches jaunes) localisés dans le cortex moteur **(A)** et l'hippocampe **(B et C)**. Images représentatives, prises au microscope confocal (barres d'échelle : 25µm). Chaque photographie du bas est un agrandissement de la région délimitée par un carré blanc en pointillé sur l'image correspondante du haut.

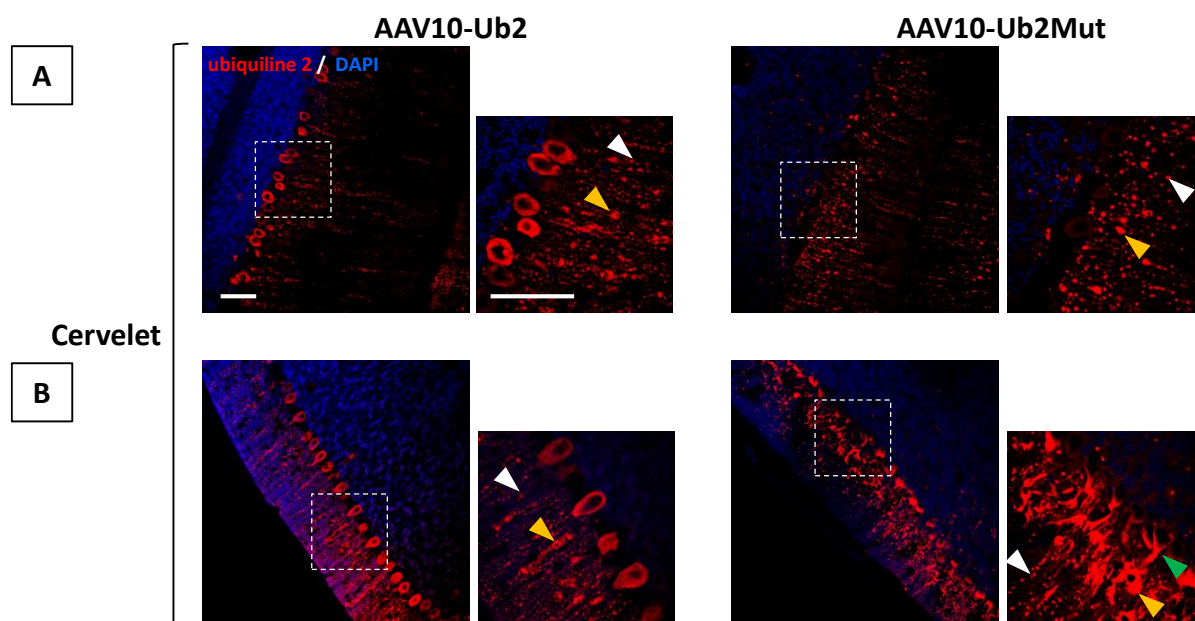


Figure 36: Présence d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 dans le cervelet des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps primaire reconnaissant les formes humaine et murine de l'ubiquiline 2 sur des coupes de cervelet (**A et B**), de souris sacrifiées un mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut (n=6). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 présentent une surexpression de l'ubiquiline 2 (marquage rouge intense) dans le cytoplasme des cellules de Purkinje ainsi que des agrégats et inclusions (indiqués par les flèches blanches et jaunes, respectivement) dans la couche moléculaire (**A et B**). Suivant la région du cervelet observée, les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut présentent soit de nombreux agrégats et inclusions positifs pour l'ubiquiline 2 dans la couche moléculaire (**A**) soit une très forte expression de l'ubiquiline 2 dans les dendrites des cellules de Purkinje (indiquée par la flèche verte) et des agrégats et inclusions dans la couche moléculaire (**B**). Photographies représentatives, prises au microscope confocal (barres d'échelle : 75µm). Chaque photographie de droite est un agrandissement de la région délimitée par un carré blanc en pointillé sur la photographie correspondante de gauche.

Dans la **moelle épinière**, les souris non injectées ou injectées avec l'AAV-GFP n'ont présenté qu'un léger marquage diffus d'ubiquiline 2 (**figure 37**). Pour les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, nous avons retrouvé le même profil d'agrégation cytoplasmique positive pour l'ubiquiline 2 que dans leur cortex moteur et leur hippocampe. De même, dans la moelle épinière des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, nous avons retrouvé de nombreux agrégats et inclusions comme dans le cortex moteur et l'hippocampe.

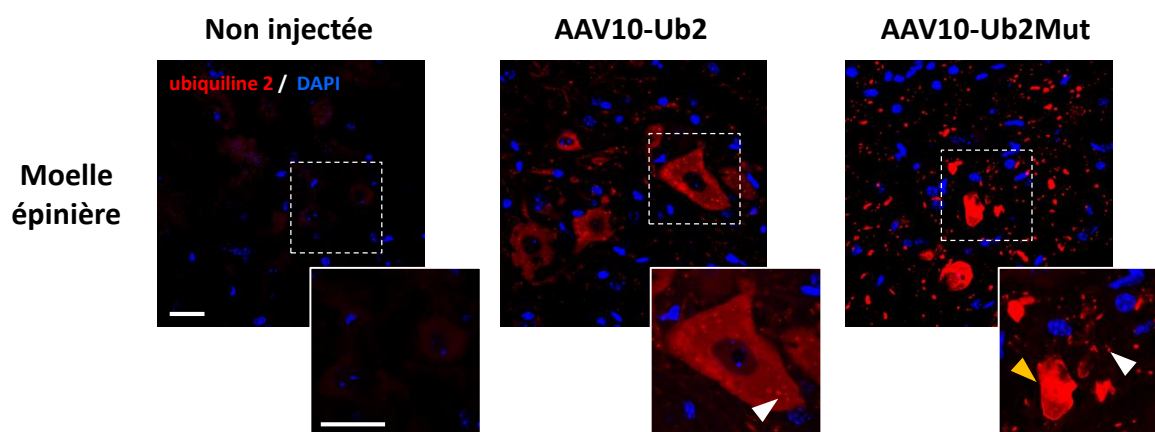


Figure 37: Présence d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 dans moelle épinière des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps primaire reconnaissant les formes humaine et murine de l'ubiquiline 2, sur des coupes de moelle cervicale de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées (n=6 par condition). Les souris non injectées expriment l'ubiquiline 2 endogène, observable par un léger marquage rouge cytoplasmique. Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 présentent une surexpression de l'ubiquiline 2 (marquage rouge intense) dans les cellules avec de petits agrégats cytoplasmiques (indiqués par les flèches blanches). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut présentent de nombreux agrégats et inclusions (indiquées par les flèches jaunes) notamment au niveau de la corne ventrale (présentée ici). Photographies représentatives, prises au microscope confocal (barres d'échelle : 25µm). Chaque photographie du bas est un agrandissement de la région délimitée par un carré blanc en pointillé sur la photographie correspondante du haut.

La surexpression de l'ubiquiline 2 mutée chez les souris sauvages conduit donc à la formation d'agrégats composés d'ubiquiline 2 dans le cerveau et la moelle épinière, comme observé chez les patients atteints de SLA-*UBQLN2*. Des agrégats ou inclusions se sont également formés lorsque l'ubiquiline 2 sauvage est surexprimée. De façon intéressante, la formation de ces agrégats a été nettement visible seulement un mois après l'injection d'AAV10-Ub2.

2.4 Les agrégats formés, suite à l'injection ICV d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut dans le cerveau et la moelle épinière des souris sauvages, sont positifs pour les protéines p62 et ubiquitine

Chez les patients atteints de SLA-*UBQLN2*, une agrégation anormale des protéines p62 et ubiquitine a été décrite dans les cellules du cerveau et de la moelle épinière (Deng *et al.*, 2011). Ces protéines, comme l'ubiquiline 2, sont impliquées dans la voie de dégradation protéique via le protéasome ou l'autophagie. Nous avons donc réalisé un marquage de ces protéines par immunofluorescence, deux mois après l'injection de nos souris avec les vecteurs AAV10. Tout d'abord, nous avons détecté la protéine **p62** dans le cytoplasme et parfois dans le noyau des cellules du **cortex moteur** et de l'**hippocampe** (gyrus denté et CA3) des souris non injectées ou injectées avec l'AAV10-GFP (**figure 38**). Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, nous l'avons détectée au sein d'agrégats cytoplasmiques et parfois nucléaires. Chez les souris injectées avec

l'AAV10-Ub2Mut, nous avons observé de nombreux agrégats ainsi que des inclusions positifs pour p62 dans le cortex moteur et l'hippocampe.

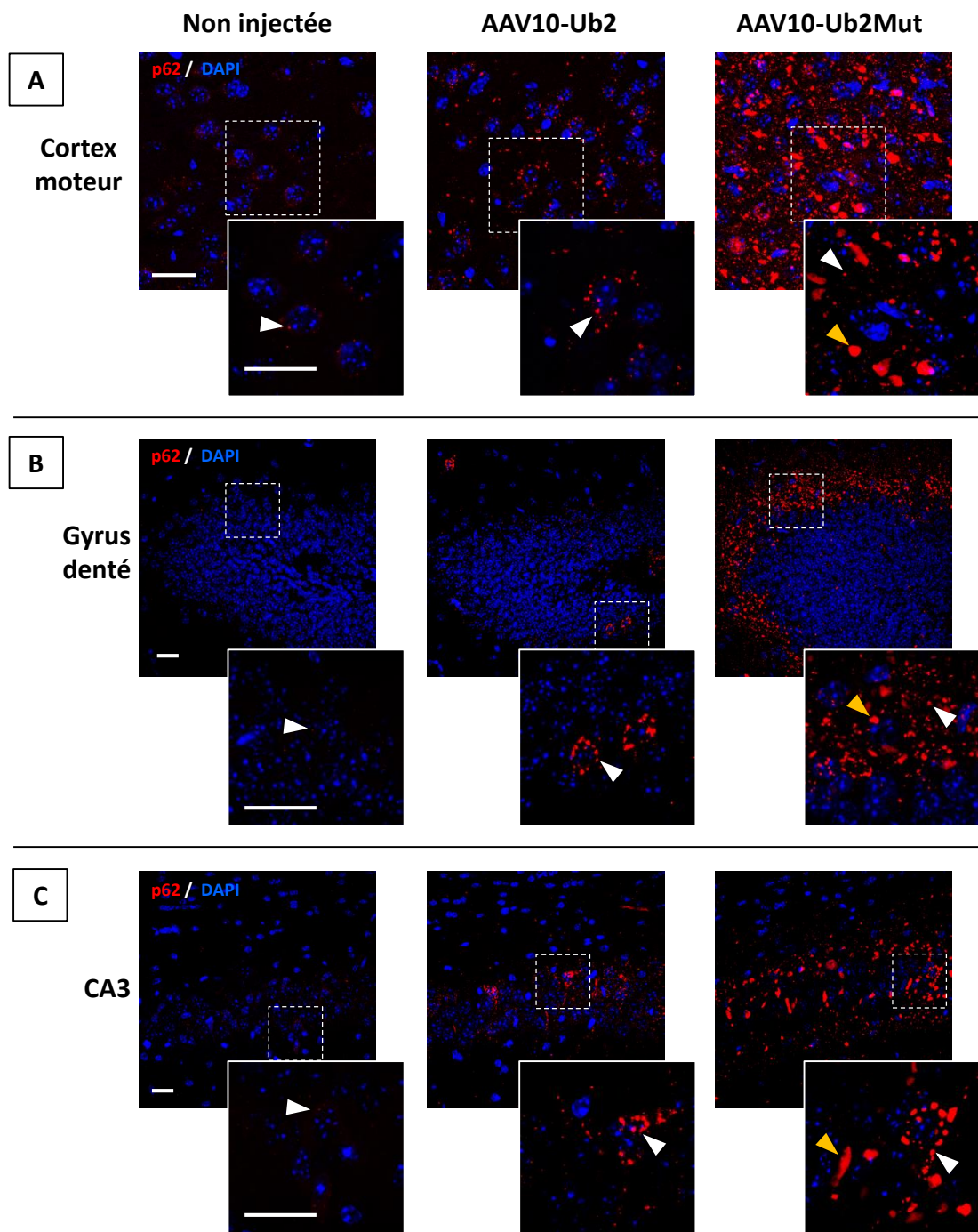


Figure 38: Présence d'agrégats positifs pour p62 dans le cerveau des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps anti-p62 sur des coupes de cerveau: cortex moteur (A), gyrus denté de l'hippocampe (B) et la région CA3 de l'hippocampe (C) de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées (n=6 par condition). Les souris non injectées présentent de petits agrégats cytoplasmiques positifs pour p62 (indiqués par les flèches blanches) dans les cellules du cortex moteur (A) et de l'hippocampe (B et C). Ils sont également présents chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, mais leur taille est nettement plus importante que chez les souris non injectées. Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, les agrégats sont beaucoup plus nombreux (A à C) que chez les autres souris et peuvent former des inclusions (indiquées par les flèches jaunes) dans le cortex moteur (A) et la région CA3 de l'hippocampe (C). Photographies représentatives, prises au microscope confocal (barres d'échelle

: 25µm). Chaque photographie du bas est un agrandissement de la région délimitée par un carré blanc en pointillé sur l'image correspondante du haut.

Dans la **moelle épinière**, les souris non injectées ou injectées avec l'AAV-GFP n'ont présenté qu'un marquage cytoplasmique diffus de p62 (**figure 39 : A**). En ce qui concerne les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, nous avons retrouvé le même profil d'agrégation cytoplasmique de p62 que celui observé dans leur cerveau (surtout du cortex moteur). Les nombreux agrégats et inclusions observés dans le cortex moteur et l'hippocampe des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, ont également été observés dans leur moelle épinière.

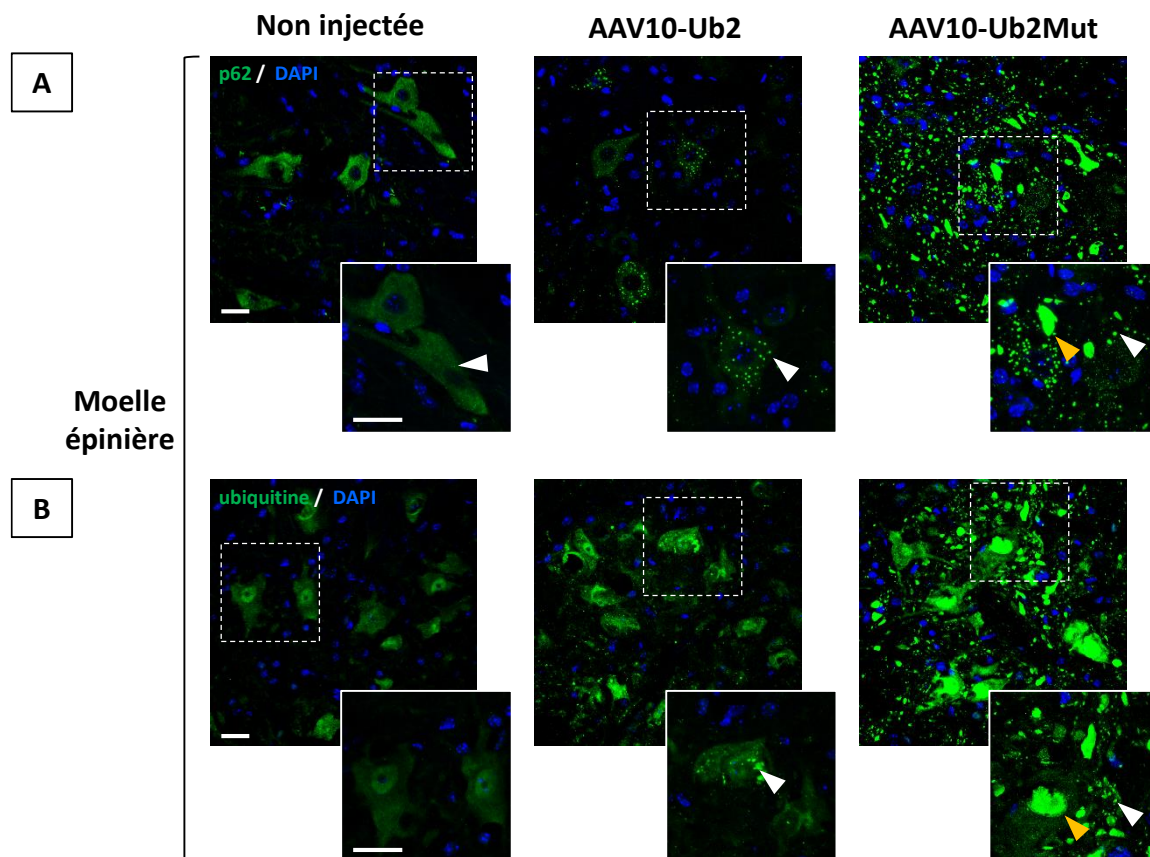


Figure 39: Présence d'agrégats positifs pour p62 et l'ubiquitine dans la moelle épinière des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps anti-p62 (**A**) et un anticorps anti-ubiquitine (**B**) sur des coupes de moelle cervicale de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées (n=6 par condition). (**A**) Chez les souris non injectées, la protéine p62 est essentiellement localisée dans le cytoplasme des cellules situées dans la corne ventrale (présentée ici) de manière diffuse avec quelques petits agrégats (indiqués par la flèche blanche). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 présentent de plus gros agrégats positifs pour p62 dans le cytoplasme et parfois dans le noyau des cellules. De nombreux agrégats et inclusions (indiquées par la flèche jaune) positifs pour p62 ont été observés chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut. (**B**) Quant à l'ubiquitine, son expression est diffuse dans le cytoplasme et le noyau des cellules chez les souris non injectées. Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, des agrégats positifs pour l'ubiquitine ont été observés dans le cytoplasme et le noyau des cellules. Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, les agrégats sont plus nombreux et peuvent former des inclusions. Photographies représentatives, prises au microscope confocal (barres d'échelle: 25µm). Chaque photographie du bas est un agrandissement de la région délimitée par un carré blanc en pointillé sur l'image correspondante du haut.

Ensuite, nous avons détecté l'**ubiquitine** de manière diffuse et localisée dans le cytoplasme et le noyau des cellules du **cortex moteur** et de l'**hippocampe** (gyrus denté et CA3) chez les souris non injectées ou injectées avec l'AAV10-GFP (**figure 40**). Dans ces mêmes régions du cerveau, nous avons observé de gros agrégats cytoplasmiques et nucléaires positifs pour l'ubiquitine chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, et de nombreux agrégats ainsi que des inclusions chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut. Dans la **moelle épinière**, l'ubiquitine est présente de manière diffuse dans le cytoplasme et le noyau des cellules chez les souris non injectées et les souris injectées avec l'AAV10-GFP (**figure 39 : B**). Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, nous avons détecté l'ubiquitine au sein d'agrégats cytoplasmiques et nucléaires. Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, les agrégats sont plus nombreux et peuvent former des inclusions.

L'expression de l'ubiquiline 2 sauvage ou mutée chez les souris sauvages induit donc l'agrégation des protéines p62 et ubiquitine dans le cortex moteur, l'hippocampe et la moelle épinière, comme cela a été observé dans la plupart des formes sporadiques ou familiales de SLA (Neumann et *al.*, 2006 ; Arai et *al.*, 2006 ; Mackenzie et *al.*, 2007 ; Deng et *al.*, 2011 ; Scotter et *al.*, 2015 ; Mitchell et *al.*, 2015 ; Saberi et *al.*, 2015 ; Mizielska et *al.*, 2014).

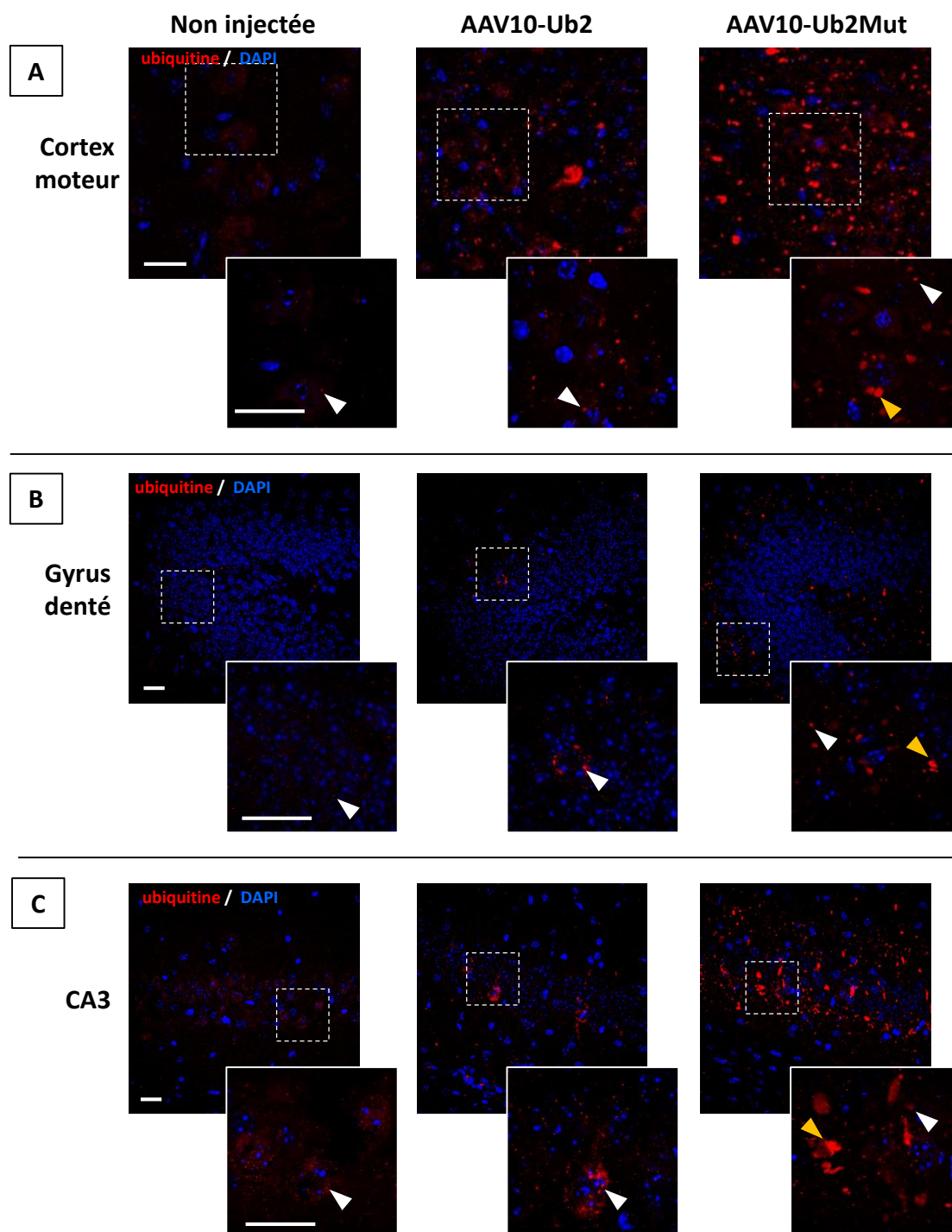


Figure 40: Présence d'agrégats positifs pour l'ubiquitine dans le cerveau des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps anti-ubiquitine sur des coupes de cerveau: cortex moteur **(A)**, gyrus denté de l'hippocampe **(B)** et la région CA3 de l'hippocampe **(C)** de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées (n=6 par condition). Chez les souris non injectées, l'ubiquitine est localisée dans le cytoplasme de manière diffuse ainsi que sous forme de petits agrégats (indiqués par les flèches blanches) dans le cytoplasme et le noyau des cellules localisées dans le cortex moteur **(A)** et l'hippocampe **(B et C)**. Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, certaines cellules présentent de plus gros agrégats que chez les souris non injectées (surtout dans le cortex moteur **(A)**). Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, ces agrégats sont beaucoup plus nombreux que chez les autres souris et peuvent former des inclusions (indiquées par les flèches jaunes) essentiellement dans le cortex moteur **(A)** et la région CA3 de l'hippocampe **(C)**. Photographies représentatives, prises au microscope confocal (barres d'échelle : 25µm). Chaque image du bas est un agrandissement de la région délimitée par un carré blanc en pointillé sur l'image correspondante du haut.

De plus, nous avons réalisé des analyses de spectrométrie de masse sur les protéines co-immunoprécipitées avec l'ubiquiline 2, qui ont montré la co-localisation de l'ubiquiline 2 mutée avec p62 et l'ubiquitine dans la moelle épinière des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut (**figure 54**), confirmant nos observations pour les analyses d'immunofluorescence.

Nous avons également réalisé des analyses d'immunofluorescence sur des coupes de moelle épinière pour le marquage de la protéine TDP-43, qui est souvent retrouvée délocalisée et agrégée dans le cytoplasme lors d'analyses *post-mortem* de patients atteints de SLA-UBQLN2 (Deng et al., 2011 ; Williams et al., 2012) ou d'autres formes familiales ou sporadiques de la maladie (Neumann et al. 2006 ; DeJesus-Hernandez et al., 2011 ; Hortobagyi et al., 2011 ; Scotter et al., 2015). Pour ces analyses, nous avons utilisé un anticorps reconnaissant la partie C-terminale et un autre anticorps reconnaissant la partie N-terminale de TDP-43. Nous n'avons pas retrouvé la protéine TDP-43 délocalisée dans le cytoplasme, ni détectée dans les agrégats protéiques des cellules de moelle épinière dans notre modèle animal, un et deux mois après l'injection des vecteurs. L'absence d'agrégat positif pour TDP-43 dans notre modèle n'exclue pas l'hypothèse que ces agrégats puissent se former, suite à la surexpression de l'ubiquiline 2, à un âge plus avancé dans la maladie comme cela a été remarqué par exemple dans les modèles transgéniques générés par Le et ses collaborateurs (2016).

2.5 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit une réduction du volume cérébral et une astrogliose dans le cerveau des souris sauvages

Nous avons voulu mieux identifier les effets de la surexpression de l'ubiquiline 2 (sauvage ou mutée) sur le cerveau des souris sauvages injectées avec les AAV10. En effet, les patients montrant des signes de DFT présentent une atrophie de la région fronto-temporale du cerveau (Ambikairajah et al., 2014). Etant donné que des signes de DFT ont été diagnostiqués dans des cas de SLA-UBQLN2, nous avons effectué des analyses stéréologiques (**figure 41 : A**) afin de mesurer la taille du cerveau des souris contrôles (non injectées ou injectées avec l'AAV10-GFP) et des souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut.

Nous avons pu ainsi remarquer que la surexpression de l'ubiquiline 2 (sauvage ou mutée) induit une **réduction du volume cérébral** (respectivement : $254 \pm 19,7 \text{mm}^3$ et $268,8 \pm 13,5 \text{mm}^3$) par rapport aux souris non injectées ($349,5 \pm 12,1 \text{mm}^3$; $P < 0,05$ dans les deux cas) ou injectées avec l'AAV10-GFP ($359,1 \pm 19,3 \text{mm}^3$; $P < 0,05$ dans les deux cas) (**figure 41 : B**). La différence entre les souris non injectées et les souris exprimant la GFP n'est pas significative. Le volume de la région du cortex est significativement réduit chez les souris surexprimant la forme sauvage ou mutée de l'ubiquiline 2 ($116,5 \pm 12,2 \text{mm}^3$ et $130,1 \pm 2,7 \text{mm}^3$, respectivement) par rapport aux souris non

injectées ($162,8 \pm 7,9 \text{ mm}^3$; $P < 0,05$ dans les deux cas) et par rapport aux souris injectées avec l'AAV10-GFP ($180,5 \pm 10,1 \text{ mm}^3$; $P < 0,05$ et $P < 0,01$, respectivement) (**figure 41 : C**). Le volume du cortex n'est pas différent entre les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et l'AAV10-Ub2Mut, ainsi qu'entre les souris non injectées et les souris injectées avec l'AAV10-GFP.

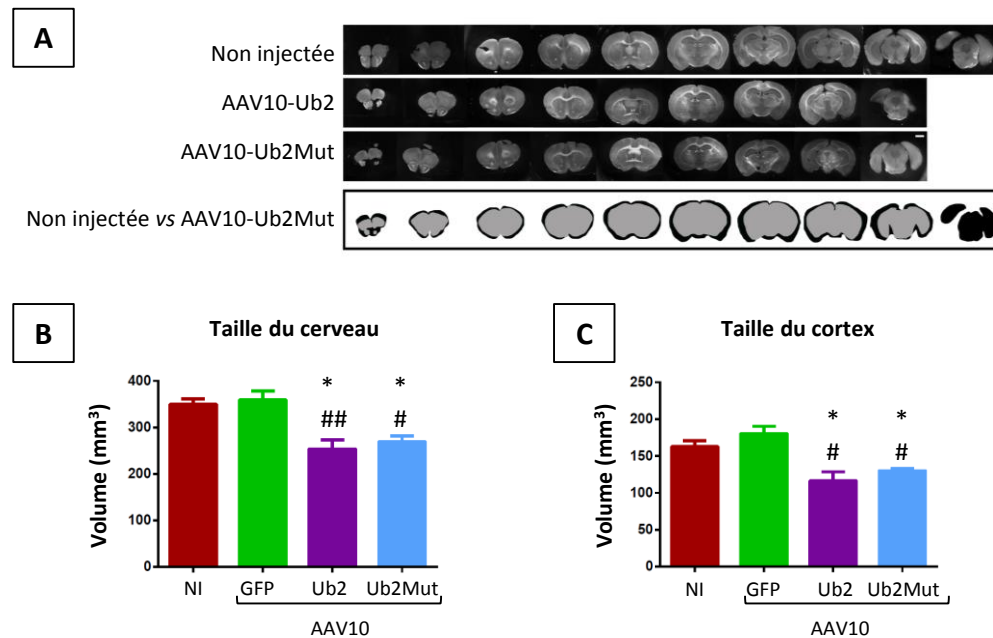


Figure 41: Réduction du volume cérébral des souris exprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

(A) Coupes stéréologiques de cerveau de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées ($n=3$ par condition), avec l'analyse du volume cérébral (B) et du cortex (C). (A) Sur les coupes transversales de cerveau, une réduction du volume cérébral est visible à l'œil nu pour les animaux injectés avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut par rapport aux souris contrôles, non injectées (NI) ou injectées avec l'AAV10-GFP (non montré ici). Le calcul des volumes moyens du cerveau entier (B) et du cortex (C) montre une réduction significative du volume cérébral et du volume cortical entre les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine (sauvage ou mutée) et les souris contrôles. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et analysés à l'aide du test de Student (* et # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; * comparaison vs NI; # comparaison vs AAV10-GFP).

Une des caractéristiques histopathologiques décrite dans la SLA est la réponse inflammatoire des astrocytes, ou astroglie (Vargas et Johnson, 2010). Nous avons donc effectué un immunomarquage spécifique des astrocytes à l'aide d'un anticorps marquant la protéine acide fibrillaire gliale (anti-GFAP) sur des coupes de cerveau (figure 42). Un mois après l'injection des vecteurs AAV10-Ub2 et AAV10-Ub2Mut, les souris ont présenté une **astroglie** dans le cortex moteur et l'hippocampe.

Les souris surexprimant l'ubiquiline 2 sauvage ou mutée ont donc présenté une diminution de leur volume cérébral et une neuro-inflammation, typiques des cas de SLA-DFT (Ambikairajah et al., 2014).

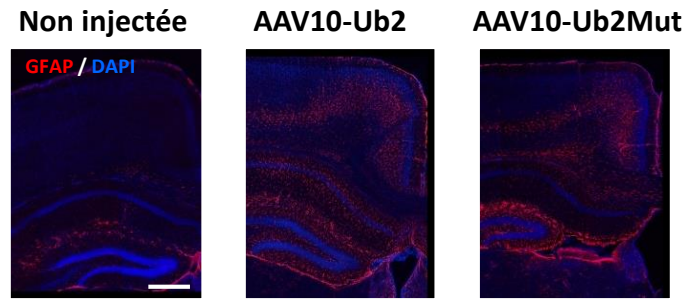


Figure 42: Astroglie observée dans le cerveau des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps anti-GFAP marquant spécifiquement les astrocytes sur des coupes de cerveau de souris sacrifiées un mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées (n=3 par condition). Contrairement aux souris non injectées, celles injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut présentent une astroglie dans les régions du cortex moteur et de l'hippocampe. Photographies représentatives, prises au microscope confocal (barre d'échelle : 500 μ m).

2.6 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit la perte des MNs et une astroglie dans la moelle épinière des souris sauvages

L'une des principales caractéristiques de la SLA est la perte des MNs localisés dans la moelle épinière (Shaw, 2005). Nous avons donc voulu déterminer si la surexpression de l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée pouvait induire une neurodégénérescence chez les souris injectées. Pour cela, nous avons réalisé un marquage des MNs, par immunofluorescence, en utilisant un anticorps anti-Choline Acétyle Transférase (ChAT) spécifique des MNs, sur des coupes de moelle épinière (régions cervicale, thoracique et lombaire) de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10 (figure 43). Suite au comptage des MNs, nous avons pu remarquer que leur nombre a été significativement réduit chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 par rapport aux souris non injectées (respectivement : $9,51 \pm 1,06$ versus $15,54 \pm 1,58$; $P < 0,01$) et cette différence a été encore plus marquée chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut pour lesquelles le nombre de MNs a été réduit de moitié par rapport aux souris non injectées (respectivement : $7,81 \pm 0,79$ versus $15,54 \pm 1,58$; $P < 0,001$). Ces résultats indiquent donc que l'injection de vecteurs AAV10 codant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée induit une **dégénérescence des MNs**.

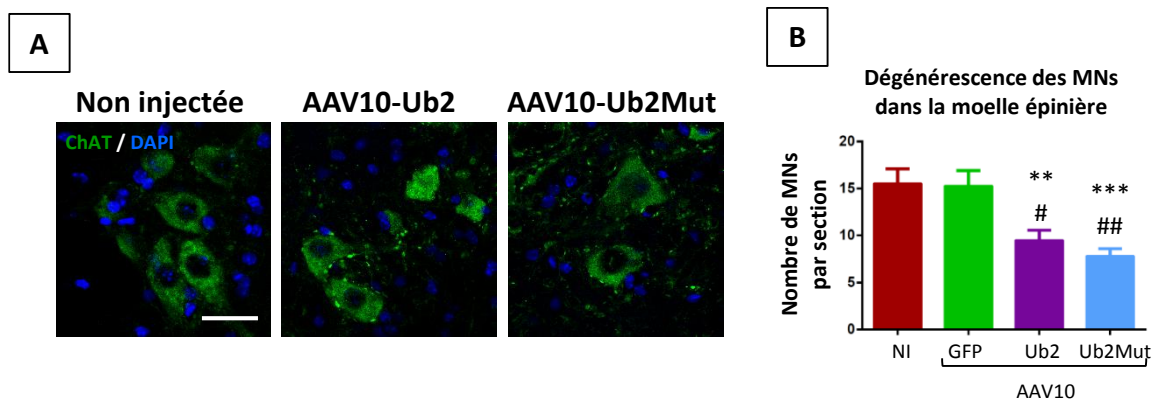


Figure 43: Perte des MNs dans la moelle épinière des souris exprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

(A) Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps spécifique des MNs (anti-ChAT) sur des coupes de moelle épinière (moelle lombaire) de souris sacrifiées un mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, qui sont comparées aux souris non injectées (n=5 par condition). **(B)** Analyses du nombre moyen de MNs par section de moelle épinière (sur toute la longueur) pour chaque groupe de souris (n=5 par condition). Le nombre de MNs est significativement réduit chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 par rapport aux souris contrôles, non injectées (NI) ou injectées avec l'AAV10-GFP, et cette réduction est encore plus significative chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM et analysés par ANOVA, post-test de Bonferroni (# P<0,05; ** et ## P<0,01; *** P<0,001; * comparaison vs NI; # comparaison vs AAV10-GFP). Photographies représentatives, prises au microscope confocal (barre d'échelle : 50µm).

Nous avons également mis en évidence une **astrogliose**, par immunofluorescence (anti-GFAP), dans la moelle épinière, et en particulier au niveau des cornes ventrales des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée (intensités de fluorescence: 8,51±0,27u.a. et 8,91±0,37u.a., respectivement) par rapport aux souris non injectées (6,90±0,17u.a.) (P<0,0001 dans les deux cas) et aux souris exprimant la GFP (6,57±0,12u.a.) (P<0,0001 dans les deux cas) (**figure 44**).

Les souris surexprimant l'ubiquiline 2 sauvage ou mutée ont donc présenté une perte de MNs et une neuro-inflammation dans la moelle épinière, comme observé dans la SLA (Shaw, 2005 ; Vargas et Johnson, 2010).

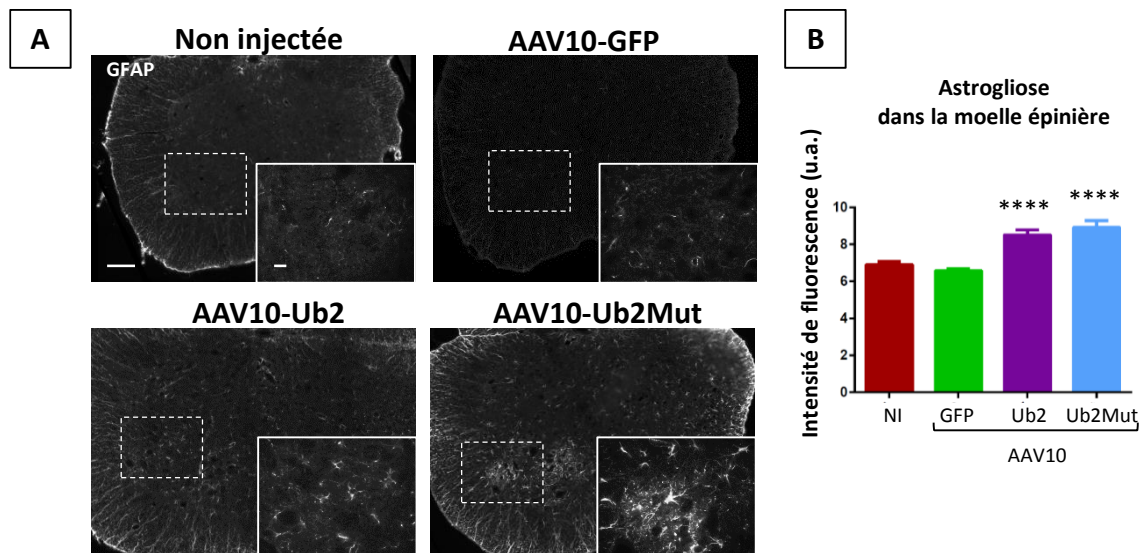


Figure 44: Astroglie observée dans la moelle épinière des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

(A) Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps marquant spécifiquement les astrocytes (anti-GFAP) sur des coupes de moelle épinière (moelle cervicale présentée ici) de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10-GFP, d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut qui sont comparées aux souris non injectées (n=3 par condition). **(B)** Analyses de l'intensité moyenne de fluorescence du marquage des astrocytes calculée pour chaque groupe de souris (n=3 par condition). L'intensité de fluorescence pour les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut est significativement augmentée comparée à celles des souris contrôles (non injectées (NI) ou injectées avec l'AAV10-GFP). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et analysés par ANOVA, post-test de Bonferroni (**** P<0,0001). Photos représentatives, prises au microscope à fluorescence (grande barre d'échelle : 200 μ m et petite barre d'échelle : 20 μ m). Chaque photographie en bas à droite est un agrandissement de la région délimitée par un carré blanc en pointillé sur l'image de moelle épinière correspondante.

2.7 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit une perte de la masse et une atrophie musculaires des souris sauvages

Chez les patients atteints de SLA, la perte progressive des MNs s'accompagne d'une atrophie et d'une faiblesse musculaire. De façon intéressante, nous avons retrouvé ce **phénotype amyotrophique** chez les souris surexprimant la forme sauvage ou mutée de l'ubiquiline 2 humaine. En effet, la masse du *Tibialis anterior* (rapport : masse musculaire en g / masse corporelle en g) a été significativement réduite chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ($0,0012 \pm 7,2e^{-5}$) et l'AAV10-Ub2Mut ($0,0010 \pm 4,2e^{-5}$) par rapport aux souris non injectées ($0,0015 \pm 6,8e^{-5}$) (P<0,05 et P<0,01 respectivement) et aux souris injectées avec l'AAV10-GFP ($0,0015 \pm 7,3e^{-5}$) (P<0,05 et P<0,001 respectivement) (**figure 45 : B**). Toutefois, aucune différence significative n'a été observée entre les souris surexprimant la forme sauvage ou mutée de l'ubiquiline 2 humaine, ni entre les souris non injectées et les souris injectées avec l'AAV10-GFP. Nous avons effectué un marquage par immunofluorescence de la membrane des fibres musculaires (anti-laminine) (**figure 45 : A**) et nous avons calculé l'aire et le nombre moyens de fibres sur des coupes transversales de muscle *Tibialis anterior* (**figure 45 : C et D**). Cette analyse a

révélé également une réduction significative de l'aire des fibres, d'environ 30%, chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 sauvage ou l'ubiquiline 2 mutée par rapport aux souris non injectées (respectivement : $830,4 \pm 55,0$ et $825,0 \pm 57,5$ versus $1193 \pm 40,9$; $P < 0,001$). De plus, le nombre de fibres est augmenté d'environ 50% chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut par rapport aux souris non injectées (respectivement : 1231 ± 80 et $1246 \pm 97,4$ versus $843 \pm 28,9$ fibres; $P < 0,01$). Les différences entre les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut et les souris injectées avec l'AAV10-GFP ne sont pas significatives, ni entre les souris non injectées et les souris injectées avec l'AAV10-GFP. Les souris surexprimant l'ubiquiline 2 sauvage ou mutée ont donc montré une perte de leur masse musculaire avec une réduction de la taille des fibres.

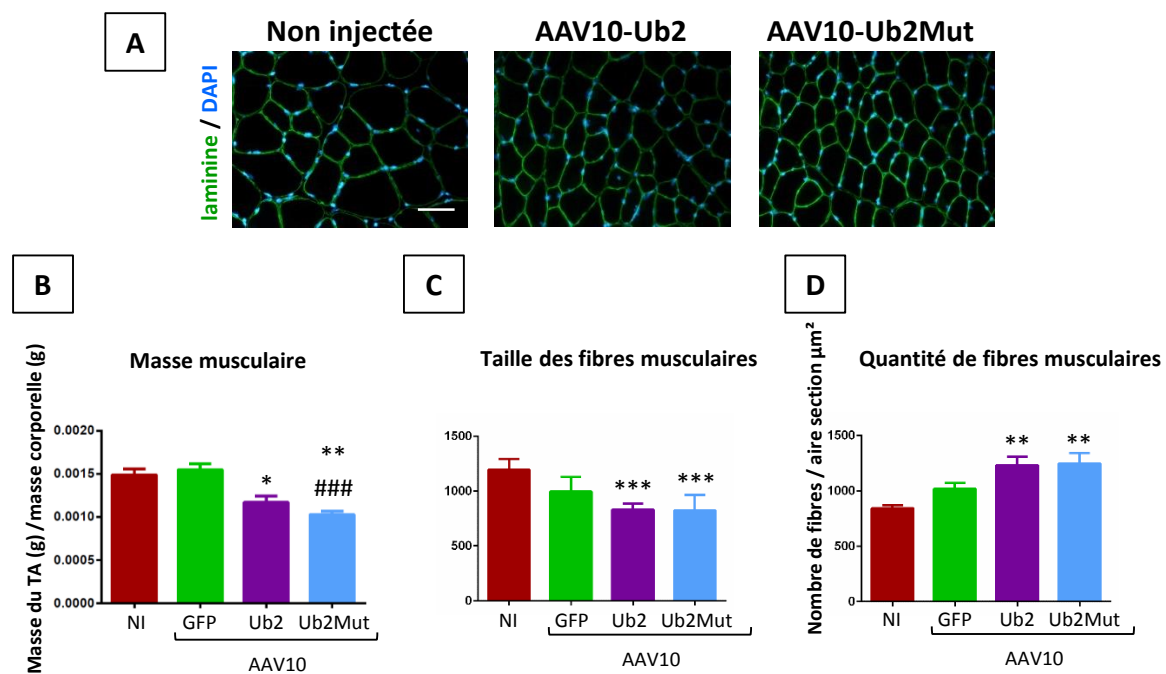


Figure 45: Observation d'une atrophie musculaire chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

(A) Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps anti-laminine marquant la membrane des fibres musculaires sur des coupes de muscle *Tibialis anterior* (TA) de souris sacrifiées un mois après l'injection d'AAV10-GFP, d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut qui sont comparées aux souris non injectées (NI) (n=6 par condition). **(B)** Analyses de la masse musculaire du TA de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10-GFP (n=3), d'AAV10-Ub2 (n=5) ou d'AAV10-Ub2Mut (n=5), qui sont comparées aux souris NI (n=3). La masse du TA est réduite chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut par rapport aux souris NI. **(C)** Mesure de l'aire des fibres rapportée à l'aire de la section transversale du TA. **(D)** Comptage du nombre de fibres musculaires par µm² réalisées à partir des images d'immunofluorescence **(A)**. L'aire des fibres musculaires est significativement réduite chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut par rapport aux souris non injectées **(C)** ainsi que le nombre de fibres musculaires **(D)** dans le TA des souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut par rapport aux souris NI. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM et analysés par ANOVA, post-test de Bonferroni (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** et ### $P < 0,001$; * comparaison vs NI; # comparaison vs AAV10-GFP). Photographies représentatives, prises au microscope à fluorescence (barre d'échelle : 50 µm).

Enfin, nous avons caractérisé le statut oxydatif des fibres musculaires des souris injectées comparées aux souris contrôles. Nous avons donc effectué une coloration des fibres positives au NADH sur des coupes de *Tibialis anterior* (**figure 46**). Le comptage des fibres oxydatives NADH (+) a révélé une augmentation de leur pourcentage chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 comparées aux souris non injectées (respectivement : $68,34 \pm 2,53\%$ versus $54,89 \pm 3,27\%$; $P < 0,05$). Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, cette augmentation est encore plus importante par rapport aux souris non injectées ($83,99 \pm 2,47\%$ versus $54,89 \pm 3,27\%$; $P < 0,01$). Cette analyse montre que la diminution de la taille des fibres musculaires est accompagnée d'un changement du statut oxydatif des fibres, signes présents dans les biopsies musculaires de patients atteints de SLA suite à la dénervation (Bogdanov et al., 2000 ; Mitsumoto et al., 2008 ; Dupuis, 2009).

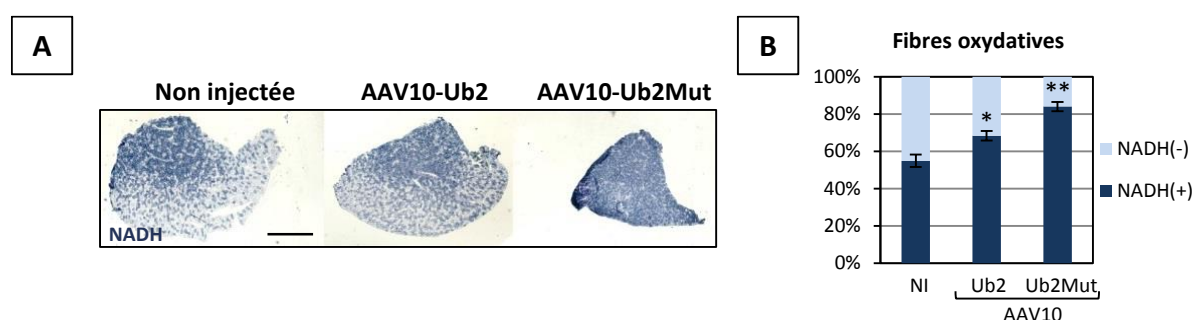


Figure 46: Augmentation du nombre de fibres musculaires oxydatives dans le *Tibialis anterior* des souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

(A) Analyses des fibres oxydatives (colorées aux NADH) réalisées sur des coupes de *Tibialis anterior* de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, qui sont comparées aux souris non injectées (n=3 par condition). (B) Analyses du pourcentage de fibres oxydatives NADH (+) pour chaque groupe de souris (n=3 par condition). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ont plus de fibres musculaires oxydatives NADH (+) que les souris non injectées (NI). L'augmentation du nombre de fibres musculaires oxydatives est plus important chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut par rapport aux souris NI. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et analysés à l'aide du test de Student (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Photographies représentatives, prises au microscope à lumière blanche (barre d'échelle : 500 μ m).

2.8 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit une réduction de la force musculaire des souris sauvages

Nous avons également voulu comprendre si la perte de MNs et la perte de masse musculaire se traduisaient par **une faiblesse musculaire** chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut. Pour cela, nous avons mesuré la force contractile du *Tibialis anterior* après une stimulation électrique du muscle (**figure 47 : A**). A l'âge d'un mois, la force contractile des souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ($55,36 \pm 4,46\text{N/g}$) ou l'AAV10-Ub2Mut ($47,49 \pm 2,50\text{N/g}$) est significativement réduite (baisse d'un tiers) par rapport aux souris non injectées ($84,92 \pm 4,19\text{N/g}$; $P < 0,001$ et $P < 0,0001$, respectivement).

Nous avons aussi effectué le test d'agrippement (« Grip test ») permettant de mesurer la force d'agrippement des quatre pattes des souris (**figure 47 : B**). Seulement un mois après l'injection, les résultats obtenus ont également montré une diminution significative de la force de traction exercée par les quatre membres (force en g/ poids en g) chez les souris surexprimant la forme sauvage ou mutée ($7,3\pm 0,3$ et $6,6\pm 0,5$, respectivement) de l'ubiquiline 2 par rapport aux souris non injectées ($8,9\pm 0,3$; $P<0,05$ et $P<0,001$, respectivement). Cette différence est également significative entre les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut et celles injectées avec l'AAV10-GFP ($8,8\pm 0,4$; $P<0,01$), mais elle n'apparaît pas significative entre les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et l'AAV10-GFP ($7,3\pm 0,3$ versus $8,8\pm 0,4$, respectivement). Aucune différence n'a été notée entre les souris non injectées et celles injectées avec l'AAV10-GFP, ainsi qu'entre les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et celles injectées avec l'AAV10-Ub2Mut.

Grâce à ces deux analyses, nous avons mis en évidence une faiblesse musculaire qui se manifeste par une perte des propriétés contractiles du muscle *Tibialis anterior* et une réduction de la force d'agrippement chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 sauvage ou mutée.

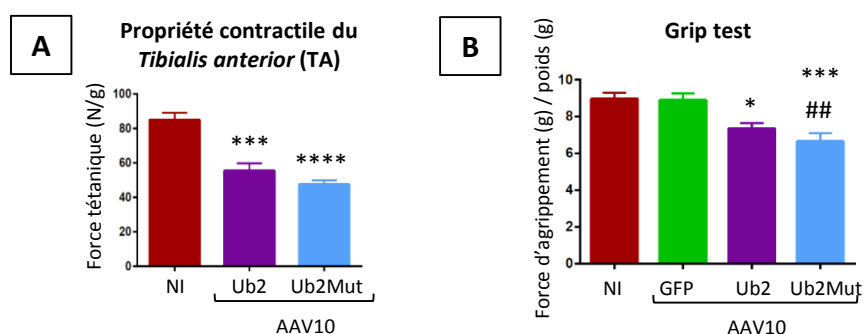


Figure 47: Observation d'une faiblesse musculaire chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

(A) Analyses de la force tétanique du TA deux mois après l'injection des souris avec l'AAV10-Ub2 (n=9) ou l'AAV10-Ub2Mut (n=9) comparées aux souris non injectées (NI, n=6). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 montrent une diminution significative de la force tétanique par rapport aux souris NI, et cette diminution est encore plus significative pour les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut. **(B)** Analyses de la force d'agrippement un mois après l'injection des souris avec l'AAV10-GFP (n=6), l'AAV10-Ub2 (n=10) et l'AAV10-Ub2Mut (n=9) comparées aux souris NI (n=11). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 montrent également une diminution significative de leur force d'agrippement par rapport aux souris contrôles (NI ou injectées avec l'AAV10-GFP) et cette diminution est nettement plus significative pour les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut par rapport aux souris contrôles. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et analysés par ANOVA, post-test de Bonferroni (* $P<0,05$; ## $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$; * comparaison vs NI; # comparaison vs AAV10-GFP).

2.9 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit des troubles moteurs chez les souris sauvages

Nous avons recherché d'éventuels **troubles moteurs** chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine par le test du « footprint ». Lors de ce test, les souris avancent en ligne droite laissant leurs empreintes sur du papier blanc grâce à de l'encre mise sur leurs pattes (**figure 48**). Avec cette méthode, nous avons pu observer une diminution de la longueur des pas chez les souris qui ont reçu des injections d'AAV10-Ub2 par rapport aux souris non injectées ($5,07 \pm 0,17$ cm et $5,61 \pm 0,13$ cm, respectivement ; $P < 0,05$) et qui était encore plus importante chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut ($4,73 \pm 0,16$ cm ; $P < 0,001$). En revanche, la distance des pas qui se chevauchent n'a pas été significativement différente entre les souris qui surexpriment l'ubiquiline 2 humaine et les souris non injectées.

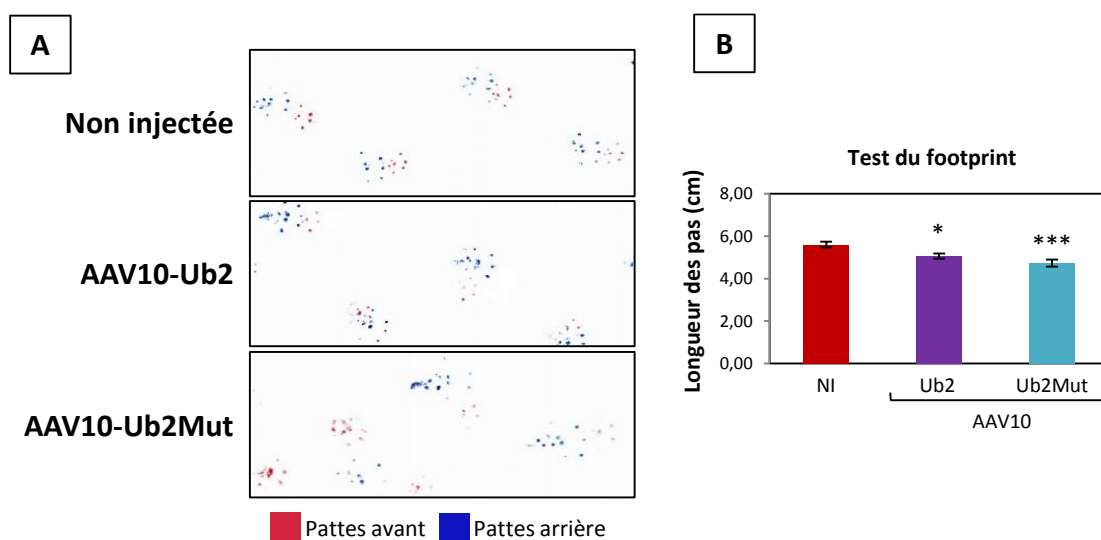


Figure 48: Observation de troubles moteurs chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses de la démarche des souris par le test du footprint (**A**) avec l'analyse de la longueur des pas (**B**) réalisées deux mois après l'injection des souris avec l'AAV10-Ub2 (n=6) ou l'AAV10-Ub2Mut (n=4), qui sont comparées aux souris non injectées (NI, n=8). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 font des pas significativement plus petits que les souris NI, et cette réduction est significativement plus importante chez les souris qui ont reçu des injections d'AAV10-Ub2Mut. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et analysés à l'aide du test de Student (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

2.10 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit des signes d'anxiété chez les souris sauvages

L'un des premiers signes de démence observé dans la SLA est l'anxiété qui amène les patients à s'isoler de la société (Strong et al., 2009 ; Raaphorst et al., 2012). Nous avons donc recherché la présence de signes d'anxiété chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2. Pour cela, nous avons analysé le comportement des souris grâce au test d'anxiété clair/obscur dans une cage divisée en deux compartiments : l'un exposé à la lumière et l'autre dans l'obscurité. Dans un premier temps, nous avons isolé les souris dans une cage pendant 30 minutes (période d'adaptation à la lumière) et dans un deuxième temps, nous avons placé les souris dans le compartiment obscur de la cage. A partir de ce moment, nous avons mesuré sur une période de 5 minutes : le temps de latence (temps passé dans le compartiment obscur avant d'entrer pour la première fois dans le compartiment éclairé), le temps total passé dans le compartiment éclairé et le nombre d'entrées dans le compartiment éclairé (**figure 49**). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut ont mis plus de temps avant d'entrer pour la première fois dans le compartiment non éclairé, comparativement aux souris non injectées (respectivement : $178,3 \pm 39,3$ min et $206,7 \pm 37,1$ min *versus* $28,4 \pm 7,1$ min ; $P < 0,01$ et $P < 0,001$) et aux souris injectées avec l'AAV10-GFP (respectivement : $178,3 \pm 39,3$ min et $206,7 \pm 37,1$ min *versus* $50,4 \pm 8,2$ min ; $P < 0,05$ et $P < 0,01$) (**figure 49 : A**). De plus, les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut ont passé moins de temps dans le compartiment éclairé que les souris non injectées (respectivement : $47,6 \pm 18,4$ min et $113,9 \pm 10,8$ min ; $P < 0,05$) (**figure 49 : B**). En revanche, chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, le temps passé dans le compartiment éclairé n'a pas été significativement différent de celui des souris non injectées ($66,4 \pm 22,5$ min et $113,9 \pm 10,8$ min). Enfin, les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et l'AAV10-Ub2Mut ($3,4 \pm 1,3$ et $2,5 \pm 1,0$, respectivement) sont entrées moins souvent dans le compartiment éclairé que les souris non injectées ($12,3 \pm 1,1$) ($P < 0,001$ dans les deux cas) et les souris injectées avec l'AAV10-GFP ($8,1 \pm 1,2$) ($P < 0,05$ dans les deux cas) (**figure 49 : C**).

La surexpression de l'ubiquiline 2 sauvage et de l'ubiquiline 2 mutée conduit à un phénotype anxieux, comme observé dans les cas de SLA avec DFT.

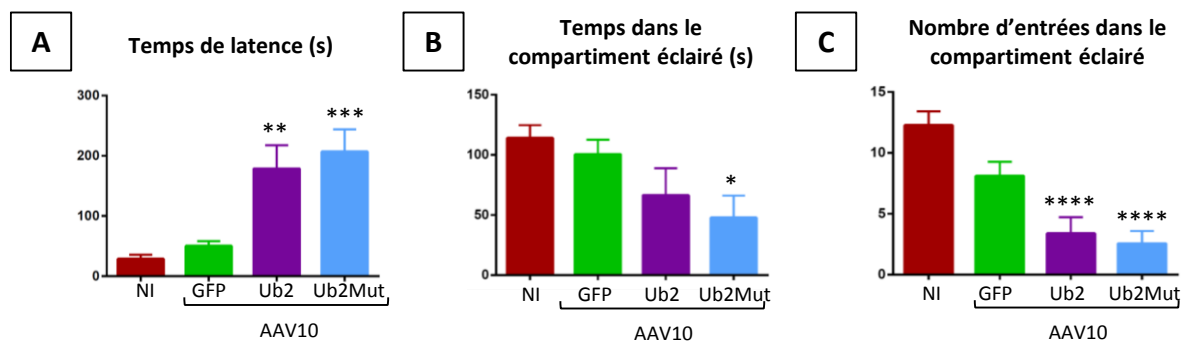


Figure 49: Observation de signes d'anxiété chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses des signes d'anxiété six semaines après l'injection des souris avec l'AAV10-GFP, l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut, qui sont comparées aux souris non injectées (NI) (n=11 par condition), à l'aide du test d'anxiété clair/obscur où le temps de latence (A) et le temps passé dans le compartiment éclairé (B) ont été mesurés, et le nombre d'entrées dans le compartiment éclairé (C) a été compté. Ce test a révélé des signes d'anxiété chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut qui ont mis plus de temps avant d'entrer pour la première fois dans le compartiment éclairé (A), qui ont passé moins de temps dans le compartiment éclairé (B) et qui sont rentrées moins souvent (C) dans le compartiment éclairé par rapport aux souris NI. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et analysés par ANOVA, post-test de Bonferroni (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; **** P<0,0001).

2.11 L'injection d'AAV10-Ub2 et d'AAV10-Ub2Mut par voie ICV induit des troubles neurologiques chez les souris sauvages

Les troubles neurologiques dans plusieurs modèles murins de maladies neurodégénératives, comme les maladies de Huntington et d'Alzheimer, sont mis en évidence par un phénotype anormal de repliement des pattes, appelé « clasping ». Ce phénotype traduit des dysfonctionnements neurologiques notamment dans la région corticale du cerveau qui influencent le contrôle moteur (Carter et al., 1999 ; Braff et al., 2001 ; Liu et al., 2011). Grâce au test de suspension par la queue, nous avons mis en évidence des **troubles neurologiques** aussi bien chez les souris injectées avec l'AAV10 codant pour la forme mutée que celles injectées avec l'AAV10 codant pour la forme sauvage de l'ubiquiline 2 (figure 50). En effet, seulement trois semaines après l'injection, 72% des souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et 76% des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut ont montré un phénotype de « clasping ».

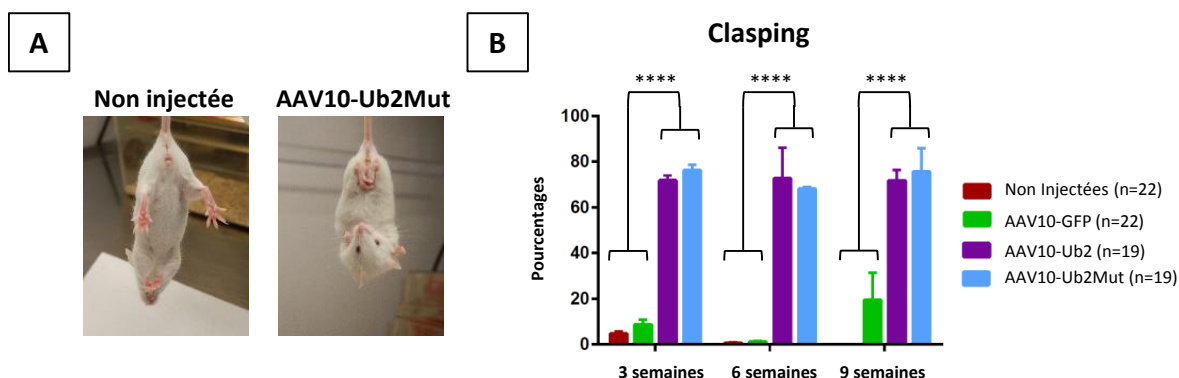


Figure 50: Observation d'un phénotype « claspings » chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses du phénotype « claspings » lors du test de suspension par la queue (photos représentatives en **A**) et pourcentage de souris faisant du « claspings » (**B**), à trois, six et neuf semaines après l'injection des souris avec l'AAV10-Ub2 (violet, n=19) ou l'AAV10-Ub2Mut (bleu, n=19), comparées aux souris AAV10-GFP (vert, n=22) et aux souris non injectées (NI, rouge, n=22). (**B**) Dès trois semaines après l'injection, le pourcentage de souris faisant du « claspings » (**A**, photo de droite) est significativement supérieur chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut par rapport aux souris contrôles (**A**, photo de gauche). Les résultats sont exprimés en pourcentage \pm SEM et analysés par ANOVA, post-test de Bonferroni (**** $P < 0,0001$).

Lors de ce test, nous avons également observé un phénotype de rotation anormale appelé « spinning » chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée qui est également considéré comme un signe de trouble neurologique (Trushina *et al.*, 2006) (**figure 51**). Deux mois après l'injection, 44% des souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et 34% des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut ont montré un phénotype de « spinning ».

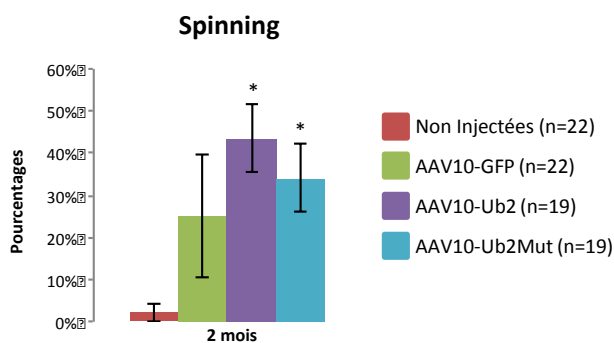


Figure 51: Observation d'un phénotype « spinning » chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée.

Analyses du phénotype « spinning » lors du test de suspension par la queue, deux mois après l'injection des souris avec l'AAV10-Ub2 (violet, n=19) ou l'AAV10-Ub2Mut (bleu, n=19) comparées aux souris injectées avec l'AAV10-GFP (vert, n=22) ou non injectées (rouge, n=22). Le pourcentage de souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut faisant du « spinning » est significativement supérieur à celui des souris non injectées. Les résultats sont exprimés en pourcentage \pm SEM et analysés à l'aide du test de Student (* $P < 0,05$).

3 Etude *in vivo* des interactions de l'ubiquiline 2 mutée avec d'autres protéines par spectrométrie de masse

3.1 La surexpression d'ubiquiline 2 mutée *in vivo* induit une augmentation de son interaction avec des sous-unités du protéasome

Afin de déterminer les interactions spécifiques entre l'ubiquiline 2 et les autres protéines, nous avons réalisé des immunoprécipitations de l'ubiquiline 2 à partir de lysats protéiques de moelle épinière provenant de souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut et de souris non injectées. Suite à l'incubation des extraits protéiques avec l'anticorps spécifique des formes humaine et murine de l'ubiquiline 2, nous avons validé l'efficacité de l'immunoprécipitation par western blot. Cette analyse a montré un enrichissement de l'ubiquiline 2 dans les échantillons traités avec l'anticorps anti-ubiquiline 2, par rapport aux lysats traités avec l'IgG contrôle (**figure 52**).

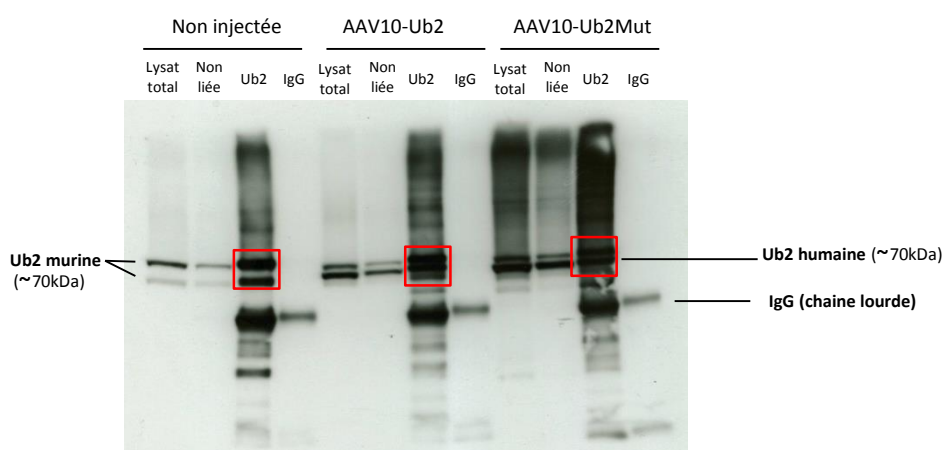
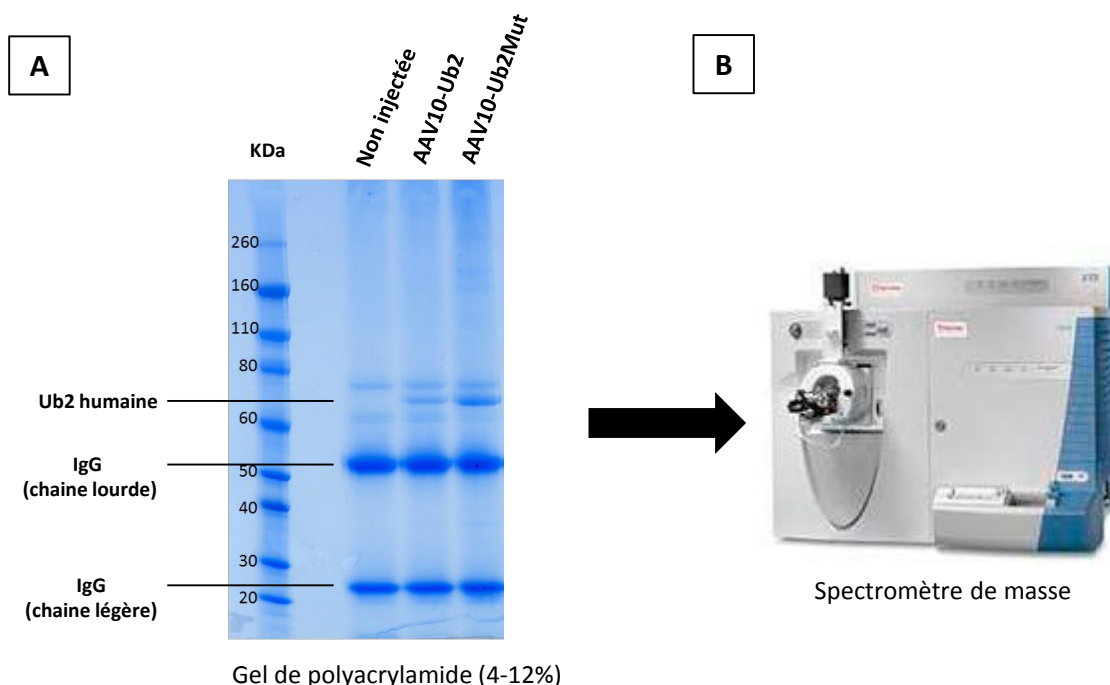


Figure 52: Vérification de l'efficacité d'immunoprécipitation par western blot.

Analyses par western blot de l'ubiquiline 2, montrant l'efficacité d'immunoprécipitation réalisées à partir d'extraits de moelle épinière de souris injectées avec l'AAV10-Ub2 (n=2) ou l'AAV10-Ub2Mut (n=4), deux mois après l'injection et comparées aux souris non injectées (n=3) du même âge. Pour chaque condition, le premier puits du gel correspond au lysat total chargé comme témoin positif; le deuxième correspond aux protéines non liées après incubation avec l'anticorps anti-ubiquiline 2; le troisième montre l'enrichissement protéique suite à l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-ubiquiline 2 et le quatrième montre le lysat protéique suite à l'incubation avec l'IgG contrôle (contrôle négatif). Les carrés rouges identifient l'ubiquiline 2. kDa: kiloDalton.

Les lysats issus de l'immunoprécipitation ont été chargés sur un gel de polyacrylamide. Après migration et coloration des protéines, le gel a été découpé en plusieurs fragments afin d'identifier les protéines co-immunoprécipitées avec l'ubiquiline 2 par spectrométrie de masse (**figure 53**).



Grâce à cette analyse, nous avons identifié plusieurs protéines interagissant spécifiquement avec l'ubiquiline 2 mutée ou sauvage chez les souris injectées par rapport aux souris non injectées (**figure 54**). Nous avons notamment observé une modification des interactions entre l'ubiquiline 2 mutée et les protéines constituant les sous-unités régulatrices et catalytiques du protéasome (**figures 54 et 55**).

Les analyses par spectrométrie de masse ont aussi permis de montrer l'interaction entre l'ubiquiline 2 mutée et les protéines p62 et ubiquitine (**figure 54**) confirmant les résultats précédemment obtenus par immunofluorescence.

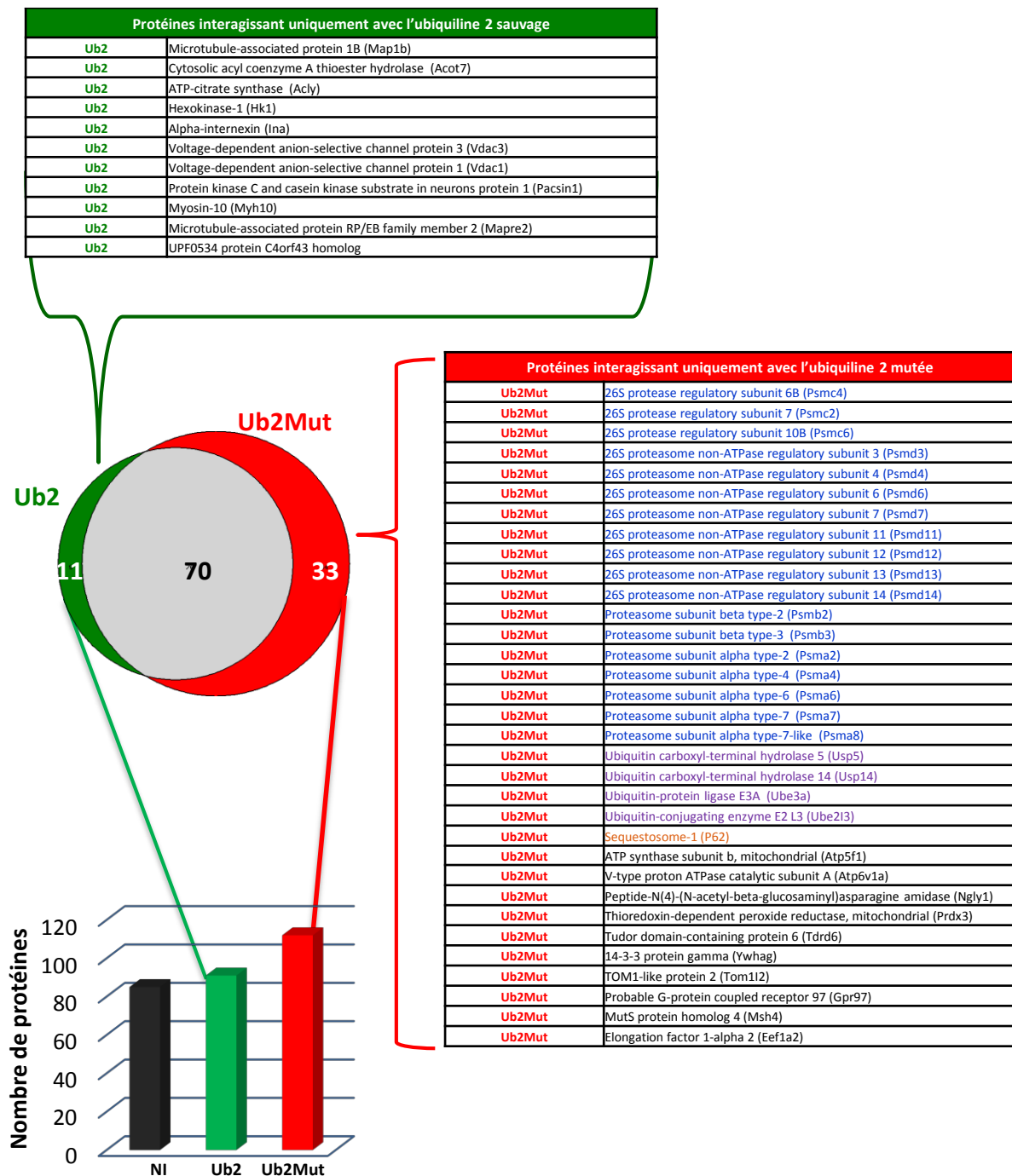


Figure 54: Liste de protéines identifiées suite à l'analyse par spectrométrie de masse.

Analyses de spectrométrie de masse réalisées sur les protéines co-immunoprécipitées avec l'ubiquiline 2 de moelle épinière de souris sacrifiées deux mois après l'injection d'AAV10-Ub2 (en vert, n=2) ou d'AAV10-Ub2Mut (en rouge, n=4), comparées aux souris non injectées (en gris, n=3). 91 protéines ont été identifiées dans les lysats de souris injectées avec l'AAV10-Ub2, 112 avec l'AAV10-Ub2Mut et 85 dans les lysats de souris non injectées. Parmi ces protéines, 33 ont été retrouvées uniquement dans les échantillons AAV10-Ub2Mut (liste en rouge) et 11 dans les échantillons AAV10-Ub2 (liste en vert). Plus de la moitié des protéines interagissant uniquement avec l'ubiquiline 2 mutée, sont des protéines du protéasome (en bleu dans la liste). Des ubiquitines (en violet) ainsi que la protéine p62 (en orange) ont également été mises en évidence chez les souris exprimant l'ubiquiline 2 humaine mutée.

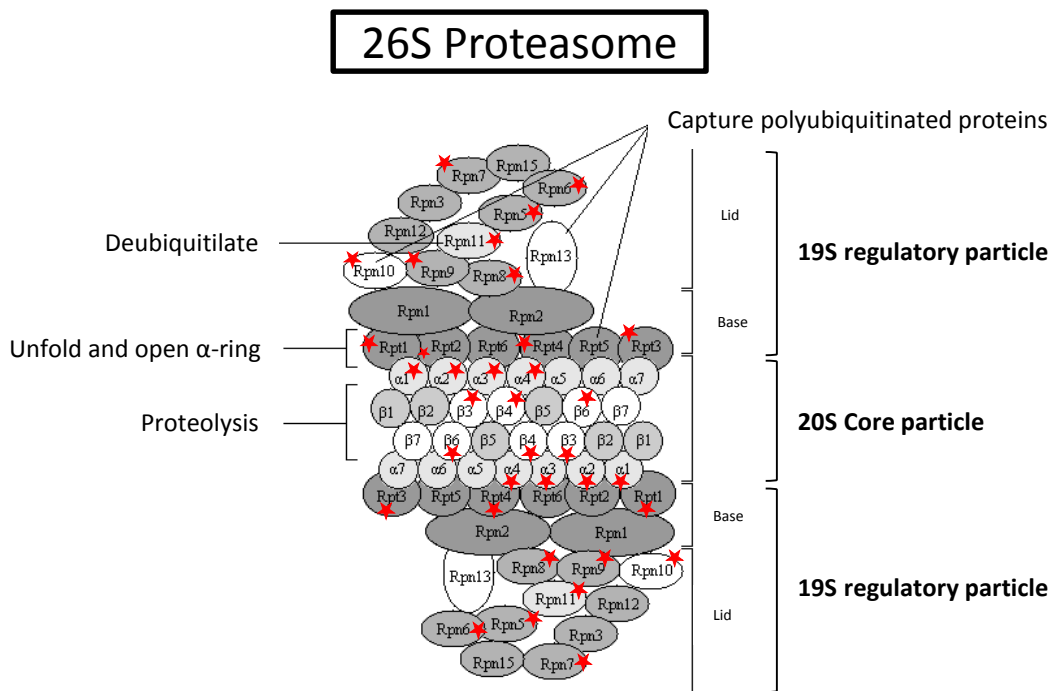


Figure 55 : Schéma du protéasome montrant les protéines interagissant uniquement avec l'ubiquiline 2 mutée.

Les protéines identifiées par spectrométrie de masse et interagissant uniquement avec l'ubiquiline 2 mutée sont indiquées par une étoile rouge. Le schéma a été réalisé à l'aide de la base de données « DAVID Bioinformatics Resources, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) ».

Compte tenu de la perturbation de l'interaction de l'ubiquiline 2 avec le protéasome mise en évidence par spectrométrie de masse, suite à la surexpression de l'ubiquiline 2 mutée dans la moelle épinière, nous avons voulu vérifier si un dysfonctionnement a également été induit dans le cerveau des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut. Pour cela, nous avons effectué des analyses de western blot montrant une augmentation du niveau de protéines ubiquitinylées chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées et aux souris injectées avec l'AAV10-Ub2 (**figure 56**).

La surexpression de l'ubiquiline 2 mutée induit donc très probablement un effet toxique en bloquant la dégradation des protéines ubiquitinylées via le protéasome, que ce soit dans la moelle épinière ou dans le cerveau.

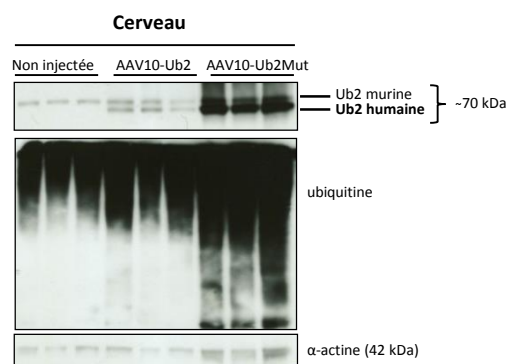


Figure 56: Western blot montrant l'accumulation anormale d'ubiquitine dans le cerveau des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut.

Analyses par western blot réalisées à l'aide d'un anticorps anti-ubiquitine et d'un anticorps anti-ubiquiline 2 sur des extraits protéiques de cerveau deux mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées (n=3 par condition). Ces analyses montrent une quantité d'ubiquitine plus importante dans le cerveau des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut par rapport à celle des souris non injectées ou injectées avec l'AAV10-Ub2. L'α-actine a été utilisée comme gène de ménage. kDa: kiloDalton.

3.2 La surexpression d'ubiquiline 2 mutée induit une perte de son interaction avec l'α-spectrine *in vivo*

De manière intéressante, l'analyse protéomique a aussi montré que la surexpression de l'ubiquiline 2 mutée entraîne une perte de son interaction avec certaines protéines clés pour le maintien des structures membranaires, comme l'α-spectrine (**figure 57 : A**). Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à cette protéine car elle est localisée au niveau de l'axone des neurones, et assure le maintien de la stabilité du cytosquelette et de ses propriétés mécaniques entre autres (**figure 57 : C**) (Xu *et al.*, 2013). De plus, elle possède un domaine SH3 permettant d'interagir avec des domaines riches en proline, comme évoqué précédemment dans l'introduction (**figure 57 : B**). La mutation P497H dans le domaine riche en proline (PXX) de l'ubiquiline 2 pourrait alors empêcher l'interaction de celle-ci avec le domaine SH3 de l'α-spectrine.

En conclusion, les analyses de spectrométrie de masse ont montré que la mutation de l'ubiquiline 2 entrainerait, d'une part, un gain de fonction toxique de la protéine se traduisant par une accumulation des protéines ubiquitylées ; et d'autre part, une perte de fonction se traduisant par une perte d'interaction avec des protéines importantes pour la physiologie neuronale. Ces deux mécanismes : gain de fonction et perte de fonction pourraient donc avoir un rôle primordial dans la physiopathologie de cette forme de SLA.

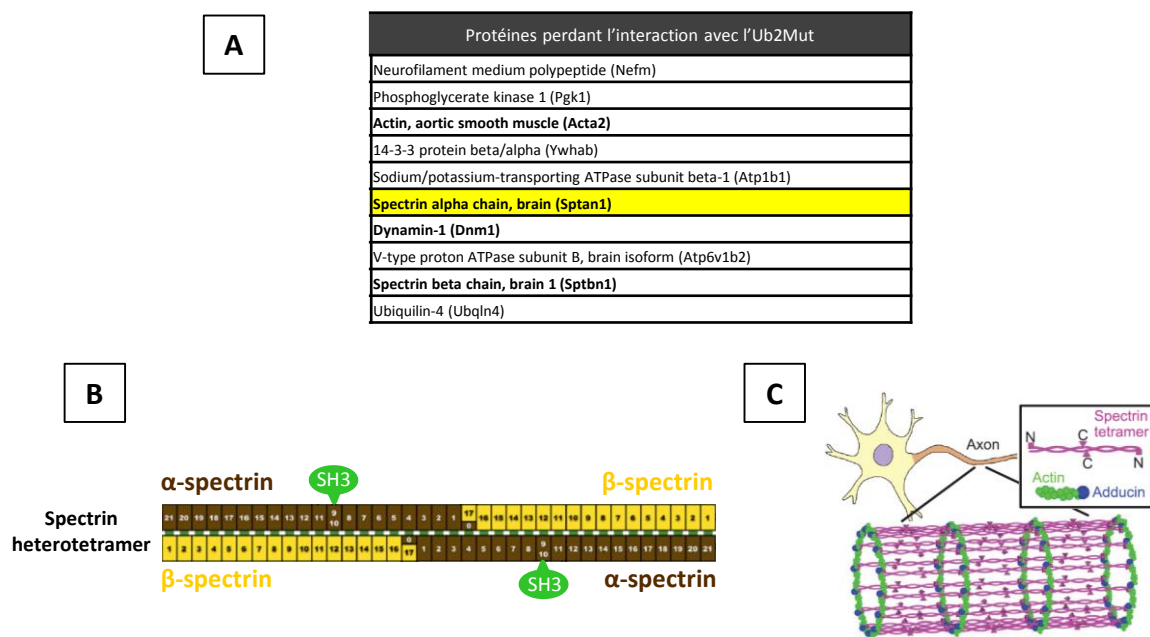


Figure 57: Perte d'interaction de l'ubiquiline 2 avec l' α -spectrine chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine mutée.

(A) Liste des protéines perdant l'interaction avec l'ubiquiline 2 mutée, identifiées par l'analyse de spectrométrie de masse. (B) Schéma de la structure de l' α -spectrine sous la forme de hétérotétramère, composée de deux chaînes alpha et deux chaînes beta. Les chaînes alpha possèdent un domaine SH3 au niveau des répétitions de spectrine 9 et 10. (C) Schéma de la structure tridimensionnelle de la membrane de l'axone, constituée de spectrine sous forme de tétramère (ou hétérotétramère) formant des chaînes positionnées parallèlement le long de l'axone. Des anneaux composés d'actine et d'adducine sont également présents entre les tétramères de spectrine (B : modifié à partir de [Brown et al., 2015](#); C: d'après [Xu et al., 2013](#)).

3.3 La surexpression d'ubiquiline 2 mutée induit une accumulation de l' α -spectrine dans des lignées cellulaires

Suite à la perte d'interaction de l'ubiquiline 2 mutée avec l' α -spectrine, observée par l'analyse protéomique, nous avons vérifié si cela pouvait modifier la quantité d' α -spectrine dans les cellules. Pour cela, nous avons analysé le niveau d'expression de cette protéine, par western blot, dans les cellules NSC-34 transfectées avec les vecteurs GFP, pcDNA-Ub2 ou pcDNA-Ub2Mut (**figure 58**). Nous avons ainsi pu observer une augmentation de la quantité d' α -spectrine (sa forme complète de 250kDa et une de ses formes clivées de 120kDa) dans les cellules exprimant la forme mutée de l'ubiquiline 2 humaine par rapport aux cellules non transfectées. Cette accumulation de l' α -spectrine pourrait être due à la perte de son interaction avec l'ubiquiline 2 qui ne pourrait donc pas l'amener au protéasome pour être dégradée.

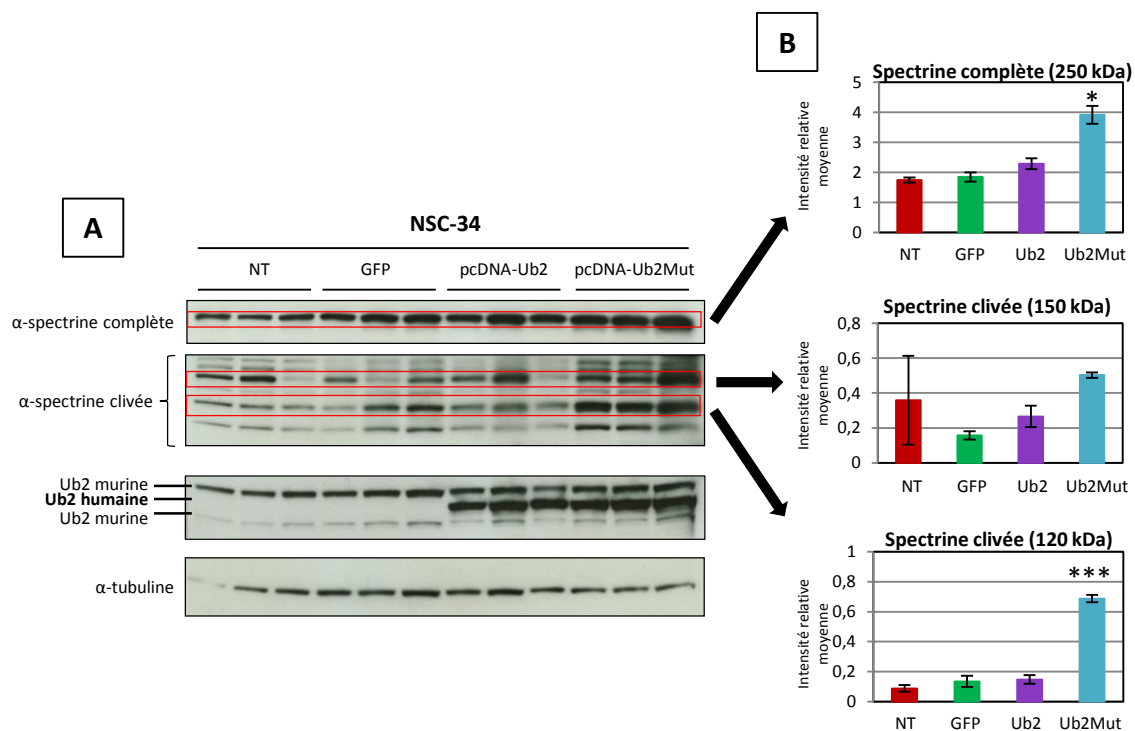


Figure 58: Accumulation des formes complète et clivées de l' α -spectrine dans les cellules NSC-34 transfectées avec le vecteur pcDNA-Ub2Mut.

(A) Analyses de western blot réalisées à l'aide d'un anticorps anti- α -spectrine, sur des lysats protéiques des cellules NSC-34 transfectées avec le vecteur GFP, pcDNA-Ub2 ou pcDNA-Ub2Mut (48h après la transfection) comparées aux NSC-34 non transfectées (NT). (B) Analyses de l'intensité moyenne des bandes obtenues par western blot (A), calculées pour chaque condition de transfection. Une accumulation de la forme complète (250kDa) et d'une forme clivée (120kDa) de l' α -spectrine a été observée dans les cellules exprimant l'ubiquiline 2 humaine mutée, comparées aux cellules NT. Concernant la forme clivée de 150kDa, la différence d'intensité entre les cellules transfectées avec le vecteur pcDNA-Ub2Mut et les cellules NT n'est pas significative à cause de la variabilité des valeurs des cellules NT. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et analysés à l'aide du test de Student (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

3.4 Les niveaux protéiques de l' α -spectrine sont modifiés dans les extraits de cerveaux de patients atteints de SLA sporadique

L'ubiquiline 2 semble avoir un rôle dans les formes familiales et sporadiques de SLA (Deng et al., 2011 ; Brettschneider et al., 2012). Nous nous sommes donc demandé si une dérégulation des niveaux d'expression d'ubiquiline 2 et d' α -spectrine pourrait être observée chez des patients atteints de SLAs. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des analyses de western blot sur des lysats protéiques de cortex cérébraux provenant de trois patients atteints de SLAs et de trois individus contrôles (figure 59 : A). Ainsi, nous avons trouvé une augmentation du niveau d'ubiquiline 2 dans le cortex cérébral des patients comparé à celui des individus contrôles (figure 59 : B et C). De plus, nous avons mis en évidence une accumulation de la forme complète de l' α -spectrine ainsi que de sa forme clivée de 150 kDa dans deux patients atteints de SLAs comparés à deux individus contrôles. Nous avons rencontré un problème d'extraction protéique pour un individu contrôle et un patient atteint de SLAs (figure 60), réduisant ainsi le nombre de cas pris en

compte dans cette analyse (deux par condition). Ces résultats sont donc à confirmer avec d'autres cas de SLAs et d'individus contrôles afin d'être en mesure d'effectuer des analyses statistiques.

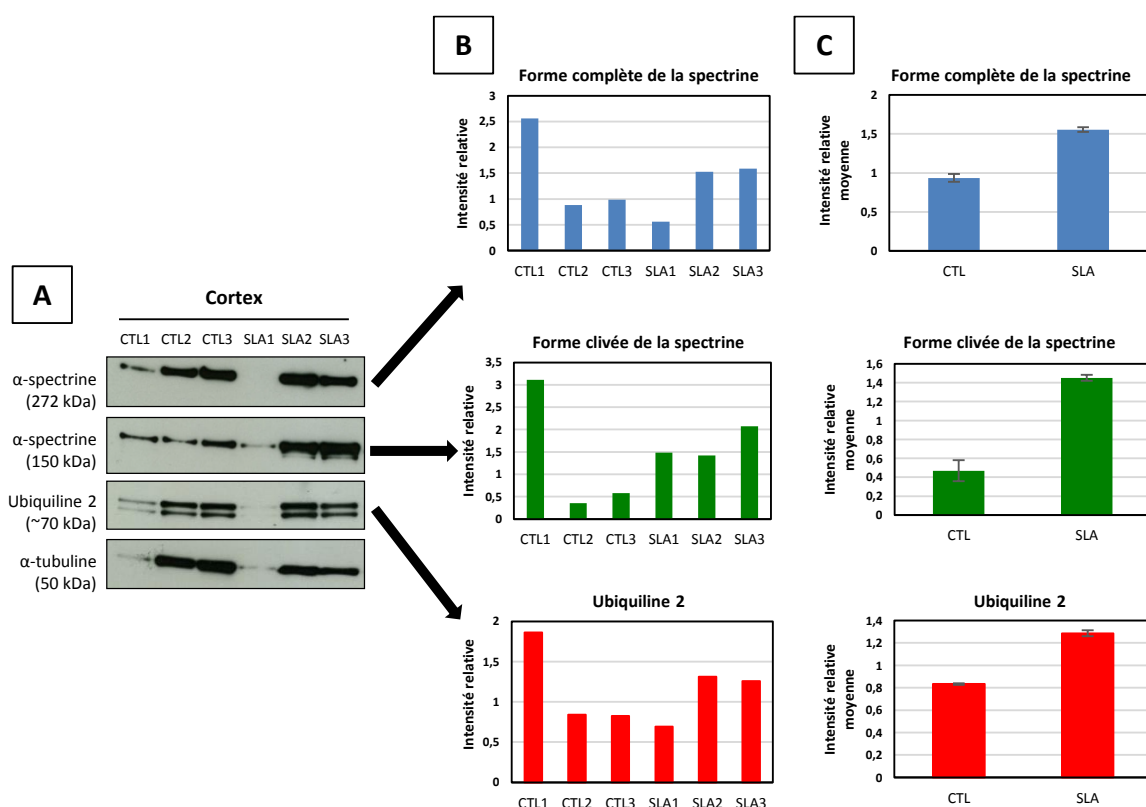


Figure 59: Accumulation des formes complète et clivée de l' α -spectrine dans le cortex de patients atteints de SLA sporadiques.

(A) Analyses de western blot réalisées à l'aide d'un anticorps anti- α -spectrine et d'un anticorps anti-ubiquiline 2, sur des lysats protéiques de cortex cérébral provenant de patients atteints de SLAs et d'individus contrôles. (B) Analyses de l'intensité de bandes pour chaque patient et individu contrôlé. (C) Analyses de l'intensité moyenne des bandes pour chaque groupe (uniquement SLA2 et SLA3, CTL2 et CTL3 pris en compte). Les échantillons SLA2 et SLA3 présentent une quantité plus importante de la forme complète et d'une forme clivée de l' α -spectrine (272kDa et 150kDa, respectivement) par rapport aux individus contrôles (CTL2 et CTL3) dans la région corticale du cerveau. La quantité d'ubiquiline 2 est également plus élevée chez les patients malades (SLA2 et SLA3) comparée aux individus contrôles (CTL2 et CTL3). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.



Figure 60: Révélation au rouge Ponceau des protéines du cortex d'individus contrôles ou atteints de SLAs, sur la membrane de transfert.

Révélation au rouge Ponceau des protéines du cortex d'individus contrôles et de patients atteints de SLAs, sur la membrane de transfert. La quantité de protéines pour les échantillons CTL1 et SLA1 est moins importante que pour les autres, malgré une même quantité de protéines chargées pour tous les échantillons.

4 Test d'un traitement au bleu de méthylène sur le modèle murin de la SLA-UBQLN2

Plusieurs études ont montré la capacité du bleu de méthylène (BM) à réduire le nombre d'agrégats pathologiques et à améliorer le phénotype dans des modèles *in vivo* des maladies d'Alzheimer et de Huntington (Paban et al., 2014 ; Sontag et al., 2012). Pendant un essai clinique de phase 2, le BM a eu un effet bénéfique sur le phénotype cognitif de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Wischick et al., 2015). Suite à ce résultat, le BM a été testé en phase 3 d'essais cliniques (Gauthier et al., 2016 ; essai clinique : NCT01689246) ainsi que sur des cas de DFTvc (essai clinique : NCT01626378).

Nous avons donc choisi de tester le BM sur notre modèle afin de voir s'il pouvait également réduire le nombre d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 et éventuellement avoir un intérêt thérapeutique dans le cas de la SLA-UBQLN2. Ce test nous a aussi permis de voir si notre modèle *in vivo* est approprié pour le test de composés thérapeutiques. Pour réaliser ce traitement, nous avons administré une solution de BM en intrapéritonéale aux souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut et aux souris non injectées, à 4 jours (3 injections/semaine durant un mois, 4mg/kg par injection). Comme contrôle négatif, nous avons administré une solution de NaCl à 0,9%.

4.1 Le traitement au BM réduit les agrégats d'ubiquiline 2 dans la moelle épinière des souris injectées avec l'AAV10-Ub2, mais les augmente chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut

Après un mois de traitement au BM (ou NaCl), nous avons quantifié le nombre d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 sur des coupes de moelle épinière (**figure 61**). Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2, le traitement au BM permet de diminuer le nombre d'agrégats par rapport aux mêmes souris traitées au NaCl ($181,60 \pm 38,91$ et $276,13 \pm 24,58$, respectivement ; $P < 0,05$). Néanmoins, leur quantité d'agrégats reste significativement supérieure à celle des souris non injectées et traitées au NaCl ($181,60 \pm 38,91$ et $12,60 \pm 4,09$, respectivement ; $P < 0,001$).

Chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, en revanche, le traitement au BM augmente fortement le nombre d'agrégats (plus de 50% d'augmentation) par rapport à celles traitées au NaCl ($4505,67 \pm 434,57$ et $2094,17 \pm 221,17$, respectivement ; $P < 0,0001$). Le BM ne permet donc pas de réduire la formation des agrégats induite par la surexpression de l'ubiquiline 2 mutée. Nous pouvons supposer que ce traitement est efficace pour réduire la formation d'agrégats de petite taille mais qu'en présence d'agrégats de grande taille, le BM favorise au contraire leur formation.

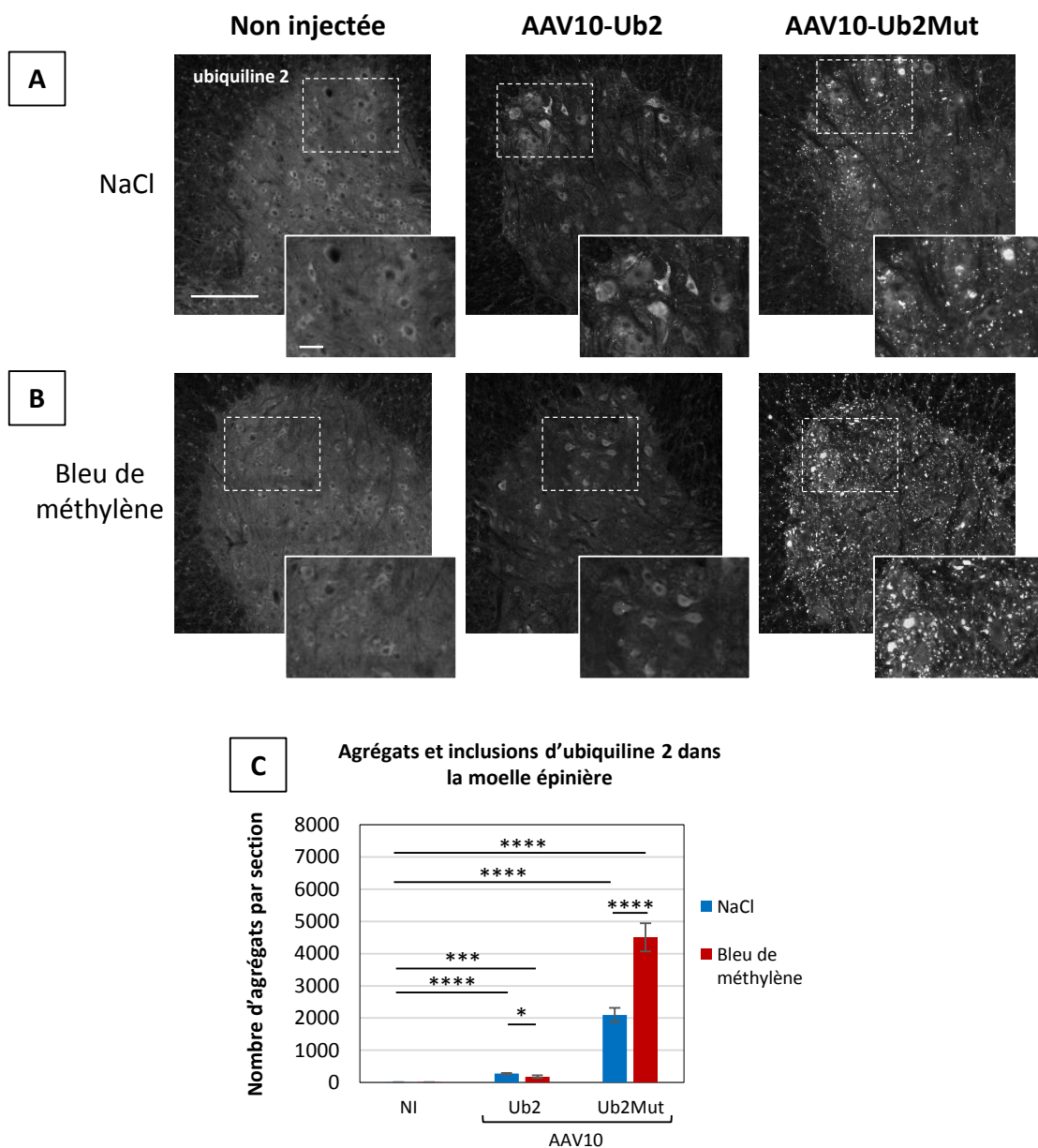


Figure 61: Analyse du nombre d'agrégats d'ubiquiline 2 suite au traitement au BM.

(A) Analyses d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps reconnaissant les formes humaine et murine de l'ubiquiline 2 sur des coupes de moelle épinière de souris un mois après l'injection d'AAV10-Ub2 ou d'AAV10-Ub2Mut, comparées aux souris non injectées, et ayant reçu des injections intrapéritonéales de BM ou de NaCl (contrôle négatif) (n=3 par condition). **(B)** Analyses du nombre d'agrégats positifs pour l'ubiquiline 2 par section de moelle épinière (n=3 par condition). Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et traitées au BM montrent une diminution du nombre d'agrégats par rapport aux souris injectées avec l'AAV10-Ub2 traitées au NaCl. Toutefois, la quantité d'agrégats des souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et au BM restent significativement supérieure à celle des souris sauvages injectées avec du NaCl. Pour les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, le traitement au BM augmente fortement le nombre d'agrégats par rapport à celles traitées au NaCl. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et analysés à l'aide test de Student (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). Photographies représentatives, prises au microscope à fluorescence (grande barre d'échelle : 200 μ m et petite barre d'échelle : 40 μ m). Chaque image en bas à droite est un agrandissement de la région délimitée par un carré blanc en pointillé sur la photographie de moelle épinière correspondante.

Etude de l'effet d'un nouveau traitement pour la SLA liée aux mutations de *SOD1* sur les jonctions neuromusculaires des souris *SOD1*^{G93A}.

Pendant mes travaux de thèse, j'ai participé à l'étude de l'effet thérapeutique d'une nouvelle thérapie génique élaborée au sein de mon laboratoire d'accueil, pour la SLA liée aux mutations de *SOD1*.

Comme décrit dans le chapitre introductif, environ 20% des cas de SLA familiale sont associés à des mutations du gène de la Superoxyde Dismutase 1 (*SOD1*) (Rosen *et al.*, 1993), lui conférant des propriétés neurotoxiques responsables de la pathogénèse. En effet, les souris *SOD1*^{G93A} transgéniques surexprimant le gène *SOD1* humain muté (h*SOD1*) présentent les symptômes typiques de la pathologie humaine (Gurney *et al.*, 1994).

La suppression de la protéine h*SOD1* mutante représente une des approches thérapeutiques les plus prometteuses de ces dernières années. Plusieurs preuves de concept ont été développées dans les modèles murins de SLA utilisant des oligonucléotides anti-sens (Smith *et al.*, 2006) ou, plus récemment, le vecteur viral associé à l'adénovirus (AAV) synthétisant de petits ARN interférents. Cependant l'efficacité de ces traitements n'a été que partielle (Foust *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2014).

Au sein de mon laboratoire, nous avons élaboré une stratégie pour réduire la h*SOD1* par modulation de l'épissage (saut d'exon) de son pré-ARN messager (ARNm) grâce à des séquences antisens (AS-h*SOD1*). Celles-ci génèrent l'apparition d'un codon stop prématuré dans le transcrit de la h*SOD1*, entraînant alors sa dégradation par le mécanisme d'élimination des ARNm non-sens (Non-sense Mediated Decay - NMD).

Afin de tester l'efficacité de cette stratégie, nous avons injecté des souris nouveau-nées (à 1 jour) ou adultes (à 50 jours) avec un AAV de sérotype 10 exprimant les AS-h*SOD1* (AAV10-AS-h*SOD1*). L'injection par voies IV et ICV de l'AAV10-AS-h*SOD1* a permis le saut d'exon de l'h*SOD1* dans la moelle épinière, entraînant une réduction de 75% de son ARNm et de 70% de sa protéine, comparée aux souris non traitées.

Le phénotype des souris *SOD1*^{G93A}, injectées à la naissance ou à 50 jours, a considérablement été amélioré avec une augmentation moyenne de l'espérance de vie de 92% et 58% respectivement, comparée aux souris contrôles. Chez les souris injectées, l'apparition de la

maladie a également été retardée avec une préservation de leurs fonctions motrices et de leur force musculaire.

Dans ce contexte, j'ai étudié l'effet de cette thérapie sur les jonctions neuromusculaires des souris traitées, comparées aux souris non traitées et aux souris sauvages. J'ai pu démontrer une préservation des jonctions de 64% chez les souris traitées à la naissance dans le muscle *extensor digitorum longus* et de 48% chez les souris injectées à l'âge adulte dans le muscle *gastrocnemius* par rapport aux souris non traitées. La publication scientifique qui décrit ce résultat est présentée en annexe.

Discussion

et

perspectives

En conclusion, nous avons généré et caractérisé, au cours de ma thèse, un modèle de SLA-DFT liée aux mutations de l'UBQLN2 à l'aide de vecteurs AAV. Nous avons étudié les défauts d'interaction de la protéine mutée de l'ubiquiline 2 dans le contexte pathologique et nous avons déterminé deux mécanismes possibles responsables de la maladie, gain de fonction et perte de fonction. Nous avons ainsi testé chez le nouveau modèle le BM, un composé déjà utilisé en essai clinique pour d'autres maladies neurologiques.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que le modèle de SLA-DFT généré par injection d'AAV codant pour l'ubiquiline 2 mutée sera utile pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires de cette pathologie complexe et pour élaborer de nouvelles thérapies.

J'ai effectué ce travail au sein de l'équipe de recherche dirigée par le Dr. Barkats, qui développe des stratégies pour cibler le SNC à l'aide de vecteurs viraux, notamment les AAV. Plus précisément son laboratoire est spécialisé dans la compréhension physiopathologique et la mise en place de stratégies thérapeutiques des maladies du MN, comme la SMA et la SLA. Cette dernière a fait l'objet de ma thèse.

La SLA est la maladie du MN la plus courante chez l'adulte (Mc Guire *et al.*, 1996 ; Pasinelli *et al.*, 2006), caractérisée par leur perte progressive dans le cortex moteur, le tronc cérébral et / ou la moelle épinière (Pasinelli *et al.*, 2006). Malgré le nombre élevé d'essais précliniques et cliniques réalisés au cours des deux dernières décennies (Zinman et Cudkowicz, 2011), aucun traitement efficace n'est actuellement disponible, à l'exception du médicament Riluzole qui offre seulement un bénéfice modeste (Bensimon *et al.*, 1994) et l'Edaravone récemment approuvé par la FDA dont les effets sont encore à démontrer (Ito *et al.*, 2008 ; Hardiman *et al.*, 2017).

Les cas de SLA sont majoritairement de forme sporadique (90-95%) et plus rarement de forme familiale (5-10%) (Renton *et al.*, 2014). Le gène responsable de la maladie est connu dans environ 70% des cas de SLA et plus de 100 gènes ont été associés à sa pathogénèse (Al-Chalabi *et al.*, 2013; mutations référencées dans la base de données « ALSod database ») ; alors que les connaissances sur les formes sporadiques de la maladie sont plus limitées. La SLA a longtemps été considérée comme une maladie spécifique du MN, mais des résultats récents ont mis en évidence l'interaction synergique d'altérations dans d'autres types cellulaires, comme les cellules gliales et musculaires responsables de l'exacerbation du phénotype pathologique (Ferraiuolo *et al.*, 2011). Actuellement, la SLA est donc considérée comme un trouble multi-systémique dans lequel les MNs ont tendance à être affectés en premier et le plus sévèrement (Ferraiuolo *et al.*, 2011).

De nombreuses questions sans réponse restent encore à étudier pour comprendre cette pathologie complexe et trouver des traitements efficaces. Les recherches que nous avons menées dans l'équipe du Dr. Barkats visent à étudier la physiopathologie de la SLA en modélisant l'une de ses principales caractéristiques pathologiques ; la formation d'agrégats de protéines. En effet, les agrégats de protéines ubiquitinyliées sont détectés dans les tissus affectés des patients atteints de différentes formes de SLA, tels que la moelle épinière, le cortex fronto-temporal, l'hippocampe et le cervelet (Al-Chalabi et al., 2012).

En 2011, Deng et ses collaborateurs ont identifié dans des formes héréditaires dominantes de SLA avec DFT, liées au chromosome X, cinq mutations dans le gène *UBQLN2* (Deng et al., 2011), codant pour la protéine ubiquiline 2. L'identification de ces mutations liées à la SLA, dans une protéine directement impliquée dans la voie de la dégradation des protéines, pourrait aider à comprendre la pathogénèse de la maladie. De plus, la pathologie de l'ubiquiline 2 a été décrite dans la moelle épinière de cas de SLA et dans le cerveau de patients atteints de SLA-DFT, avec ou sans mutations de l'ubiquiline 2, suggérant un processus pathogène commun associé aux inclusions positives à l'ubiquiline 2 dans les SLAf et SLAs.

Le rôle pathologique de l'ubiquiline 2 dans la pathogénèse de la SLA avec ou sans démence n'est pas encore bien déterminé. Nous avons donc décidé de développer un modèle animal pour la SLA liée à l'*UBQLN2*, afin de comprendre les mécanismes pathologiques de sa mutation, d'étudier la formation d'agrégats de protéines *in vivo* et d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la SLA et la SLA-DFT.

1) Transfert de gène à l'aide de vecteurs AAV pour la génération de modèles animaux

Afin de générer un modèle murin pour cette forme de SLA et SLA-DFT, nous avons utilisé des AAV10 pour le transfert du gène *UBQLN2* chez des souris sauvages. Nous avons produit des AAV10 renfermant l'ADNc humain de l'ubiquiline 2 sauvage ou mutée (ubiquiline 2^{P497H}), sous le contrôle du promoteur PGK, dans un génome simple brin d'AAV. Le promoteur PGK a été choisi pour sa capacité à diriger une expression élevée et constitutive de gènes ectopiques (Régulier et al., 1998). En particulier, la stabilité de l'expression de transgènes par PGK confère à ce promoteur un grand avantage sur celui du cytomégalovirus, pour lequel une diminution significative de l'activité de transcription au cours du temps a été rapportée (Tenenbaum et al., 2004). Dans le SNC, un vecteur lentiviral exprimant lacZ, sous contrôle du promoteur PGK, a montré *in vivo* une expression préférentielle dans les neurones, justifiant davantage notre choix (Déglon et al., 2000).

Afin d'obtenir une expression efficace de l'ADNc *in vivo*, nous avons également inséré un intron chimérique immédiatement en aval du promoteur PGK (**figure 28**). Des études ont en effet montré que les introns hétérologues permettent d'augmenter l'expression des gènes en influençant l'initiation ou l'élongation de la transcription (via des amplificateurs ou d'autres éléments agissant *in cis*), en améliorant la stabilité de l'ARNm dans le noyau (via le processus d'épissage des ARNm) ou en facilitant l'ouverture des domaines chromosomiques (Brinster *et al.*, 1988 ; Palmiter *et al.*, 1991).

En outre, toujours dans le but d'augmenter l'expression du transgène, nous avons ajouté la séquence de l'élément régulateur post-transcriptionnel WPRE, en aval de l'ADNc. Cet élément stimule l'expression des séquences virales sans intron et permet l'expression efficace et à long terme de transgènes pour la thérapie génique (Loeb *et al.*, 1999).

Parmi les différentes mutations de l'ubiquiline 2 décrites par Deng et ses collaborateurs, nous avons choisi de surexprimer l'ADNc de l'ubiquiline 2 portant la mutation P497H car elle montre une pénétrance complète (Deng *et al.*, 2011).

L'AAV10 recombinant a été administré par injection ICV bilatérale chez des souris FVB nouveau-nées. Un AAV10 codant pour la GFP, injecté dans les mêmes conditions, a été utilisé comme témoin. Cette méthode de transfert de gènes assure une transduction importante du SNC, ainsi que des tissus périphériques et en particulier du muscle squelettique, comme en témoignent les analyses d'expression de la GFP (**figure 31**) et comme reporté dans la littérature (Meyer *et al.*, 2015 ; Armbruster *et al.*, 2016).

La modélisation de maladies neurodégénératives via l'AAV représente une stratégie alternative intéressante comparée aux lésions neurochimiques (Ferrante *et al.*, 1993) ou à la transgénèse classique (Dayton *et al.*, 2012). En effet, l'injection de vecteurs viraux permet de générer plus rapidement un modèle animal avec un coût plus réduit que le développement et le maintien de lignées transgéniques. L'utilisation de différents sérotypes et de différentes doses d'AAV permet de moduler la sévérité de la maladie et de cibler spécifiquement certains types cellulaires en fonction du tropisme des vecteurs viraux (Klein *et al.*, 2008). Un autre avantage important de cette stratégie est la possibilité de modéliser la maladie à un âge spécifique, afin d'étudier l'effet des mutations au cours du temps (Klein *et al.*, 2010). Enfin, cette méthode peut être utilisée dans toutes les espèces animales et particulièrement chez les mammifères de grande taille dans le cadre d'études précliniques (Duque *et al.*, 2015).

Pour la génération de notre modèle animal, nous avons décidé d'induire une expression ubiquitaire de l'ADNc de l'ubiquiline 2 en raison de la nature multi-systémique de la SLA. Toutefois le transfert de gène à l'aide d'AAV pourrait être utile pour comprendre la contribution spécifique

des organes dans la pathogénèse, grâce à l'utilisation de promoteurs spécifiques. L'expression spécifique de l'ubiquiline 2 dans le muscle squelettique, par exemple, pourrait aider à définir la contribution de ses mutations ainsi que l'altération de son expression au phénotype amyotrophique. Par extension, il pourrait également être intéressant d'utiliser cette méthode pour étudier le lien entre l'altération de la protéostasie et la maladie dans différents types cellulaires ou organes.

L'expression somatique de la mutation permettrait aussi de comprendre les mécanismes pathologiques en excluant les possibles effets compensatoires intervenant pendant le développement, comme cela peut se produire lors de l'utilisation de souris transgéniques.

2) Caractéristiques des modèles de souris surexprimant la forme sauvage ou mutée de l'ubiquiline 2 humaine

Suite à l'administration ICV des vecteurs AAV10-Ub2 et AAV10-Ub2Mut, nous avons analysé l'expression de l'ubiquiline 2 humaine dans les extraits protéiques de cerveau et de moelle épinière, un mois après l'injection (**figure 33**). Malgré l'injection de la même quantité de vecteurs, nous avons observé un niveau d'expression protéique de l'ubiquiline 2 humaine mutée plus élevé par rapport à celui de l'ubiquiline 2 humaine sauvage. Cette accumulation d'ubiquiline 2 mutée pourrait être due à un mécanisme de propagation de type prion qui a déjà été décrit pour la SOD1 mutée ([Chattopadhyay et al., 2008](#) ; [Ayers et al., 2016](#)). Nous avons également observé qu'après l'injection d'AAV10, les niveaux d'ubiquiline 2 humaine sauvage étaient similaires à ceux de la protéine murine endogène. Les niveaux de la protéine mutante sont, en revanche, 2,5 fois supérieurs dans le cerveau et 3 fois supérieurs dans la moelle épinière, par rapport à ceux de la protéine endogène. Ce niveau élevé d'expression de l'ubiquiline 2 mutée pourrait être responsable du phénotype sévère des souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut, par rapport au phénotype observé chez les modèles animaux décrits précédemment ([Le et al. 2016](#)).

Les analyses d'immunofluorescence ont mis en évidence la présence d'inclusions positives pour l'ubiquiline 2 dans le cerveau et la moelle épinière des animaux surexprimant l'ubiquiline 2 mutée (**figures 35 à 37**), comme chez les patients atteints de SLA avec démence observés par [Deng et ses collaborateurs \(2011\)](#). Des agrégats de plus petite taille, ont également été observés dans les tissus provenant de souris injectées avec la forme sauvage de l'ubiquiline 2. Les inclusions et les agrégats observés suite à la surexpression des deux formes d'ubiquiline 2 sont positifs pour les protéines p62 et ubiquitine (**figures 38 à 40**), cela confirmant l'hypothèse du dysfonctionnement de l'ubiquiline 2 dans la protéostasie et l'autophagie.

Suite à l'expression des deux formes de l'ubiquiline 2, les agrégats ont suivi un schéma de distribution spécifique avec une accumulation dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet. La reproductibilité du profil d'agrégation dans notre modèle ainsi que dans les autres modèles de rongeurs exprimant l'ubiquiline 2 mutée (Gorrie *et al.*, 2014 ; Ceballos-Diaz *et al.*, 2015 ; Wu *et al.*, 2015 ; Hjerpe *et al.*, 2016 ; Le *et al.*, 2016), suggère que ces régions sont plus sujettes à l'expression et à l'accumulation d'inclusions positives pour l'ubiquiline 2. Cependant les mécanismes à la base de ce phénomène sont encore à élucider.

Lors des analyses d'immunofluorescence de l'ubiquiline 2, la présence de gros agrégats a rendu difficile l'identification des cellules neuronales des souris surexprimant la forme mutée. Nous avons donc supposé que les inclusions induites par la surexpression de l'ubiquiline 2 mutée, engendrent une neurodégénérescence.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué un marquage spécifique des MNs dans la moelle épinière et mis en évidence leur perte dans les régions cervicale, thoracique et lombaire. De façon intéressante, la mort des MNs a été observée à la fois chez les animaux injectés avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut avec un phénotype moins sévère pour les souris exprimant la forme sauvage (**figure 43**).

Les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut ont montré un phénotype très sévère, avec une mort prématurée, comparées aux souris contrôles (**figure 34**). Au contraire, nous n'avons pas observé de mortalité précoce des souris injectées avec l'AAV10-Ub2 pendant l'étude. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure qu'en suivant ces animaux au-delà de sept mois, nous n'aurions pas révélé un effet sur la survie.

Les souris injectées avec les deux formes d'ubiquiline 2 ont montré une perte de poids significative seulement un mois après l'injection (**figure 34**). La perte de poids observée chez les souris injectées avec l'ubiquiline 2 mutée a été progressive jusqu'à la fin de leur vie, contrairement à ce qui a été observé chez les souris injectées avec la forme sauvage qui retrouvent un poids normal à partir de deux mois. Probablement, la surexpression de l'ubiquiline 2 sauvage a un effet notoire dans les premières semaines de vie des souris, mais cet effet est atténué au cours du temps par des mécanismes compensatoires.

Les souris surexprimant la forme sauvage ou mutée de l'ubiquiline 2 ont développé une faiblesse musculaire et une perte de masse musculaire (**figure 45**). Nous avons également observé une diminution progressive de la force musculaire (**figure 47**) concordant avec la perte de MNs. Nous avons aussi mis en évidence une altération de leur démarche, significativement différente de celle des souris non injectées (**figure 48**).

Lors du test de suspension par la queue les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut ont aussi présenté des troubles neurologiques tels que le « claspings » (**figure 50**) et le « spinning » (**figure 51**). Ces phénomènes ont également été décrits dans d'autres modèles murins pour des maladies neurodégénératives telle que la maladie de Huntington (Zacharoff et al., 2011) ou dans d'autres conditions neurologiques (Trushina et al., 2006).

Afin d'évaluer des signes de démence, les souris ont été soumises à un test d'anxiété clair/obscur, révélant un fort phénotype anxieux chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 mutée (**figure 49**). Ce test a été effectué lorsque les souris étaient encore capables de marcher. En effet, chaque souris s'est déplacée au moins une fois d'un compartiment à l'autre pendant l'exécution du test, indépendamment du type d'injection reçu. Avant le passage dans la cage clair/obscur, les souris ont eu une période d'adaptation à l'isolement et à l'éclairage. Cette étape a permis de réduire le stress provoqué par le passage dans un nouvel environnement. Les souris non injectées et les souris injectées avec l'AAV10-GFP ont montré une activité normale pendant le déroulement de l'expérience, en se déplaçant avec curiosité d'un compartiment à l'autre dès le début. Les souris contrôles ont ensuite choisi de rester dans le compartiment éclairé en exerçant une activité motrice spontanée. Au contraire, les souris injectées avec l'ubiquiline 2 ont préféré rester dans le compartiment obscur, représentant une forme de protection à l'environnement extérieur. Ce comportement peut être considéré comme un symptôme d'anxiété. Nous n'avons pas effectué d'autres tests comportementaux, comme par exemple le test de mémoire, mais il est possible que nos souris développent des troubles de la mémoire, vu la présence d'agrégats dans l'hippocampe.

Lors des différentes analyses, nous avons comparé les souris injectées avec l'AAV10-GFP aux souris non injectées, nous n'avons pas observé de différences significatives, indiquant que les effets observés chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2 et l'AAV10-Ub2Mut sont bien spécifiques de l'expression du transgène *UBQLN2* et non du vecteur. Cependant, lors du test d'anxiété (**figure 49**) et de l'analyse histologique des fibres musculaires (**figure 45**), nous avons observé une tendance vers le phénotype pathologique des souris injectées avec l'AAV10-GFP. L'expression de la GFP pourrait avoir donc un effet physiologique sur certaines fonctions.

Dans l'ensemble, la surexpression de l'ubiquiline 2 sauvage a conduit à un phénotype pathologique moins sévère que celui généré par la surexpression de l'ubiquiline 2 mutée. Cela suggère que l'ubiquiline 2 peut avoir un rôle primordial pour la physiologie de la cellule et donc que son altération pourrait jouer un rôle important dans les différentes formes de SLA, y compris sporadiques.

3) Intérêt du modèle surexprimant l'ubiquiline 2 humaine mutée par rapport aux modèles existants

Depuis l'identification des premières mutations dans le gène *UBQLN2* chez les patients atteints de SLA et SLA-DFT, plusieurs groupes de recherche ont généré des modèles animaux de SLA-*UBQLN2* (Gorrie et al., 2014 ; Ceballos-Diaz et al., 2015 ; Wu et al., 2015 ; Hjerpe et al., 2016 ; Le et al., 2016). Malgré ces efforts, aucun modèle ne récapitule simultanément les altérations histologiques, les défauts cognitifs et moteurs typiques de la SLA-DFT. En particulier, des modèles transgéniques de souris et de rat exprimant l'ubiquiline 2^{P497H}, présentent des déficiences de la mémoire, mais pas de perte de MNs (Gorrie et al., 2014 ; Wu et al., 2015). Dans ces lignées, les agrégats d'ubiquiline 2 ont été observés dans l'hippocampe de manière similaire à ceux observés chez les patients portant des mutations de l'ubiquiline 2. D'autre part, un modèle de souris knock-in exprimant l'ubiquiline 2^{P520T}, a développé des déficiences cognitives et des inclusions d'ubiquiline 2 dans le cerveau, mais n'a pas non plus montré de signes de mort des MNs (Hjerpe et al., 2016). Les souris injectées avec des AAV2/8r, portant les mutations P497S ou P506T de l'ubiquiline 2, ont présenté des altérations de coordination par rapport aux souris surexprimant l'ubiquiline 2 sauvage ou l'ubiquiline 2^{P497H} (Ceballos-Diaz et al., 2015). Cependant, la cause de la variation de leur performance motrice n'a pas été décrite et la dégénérescence des MNs n'a pas été étudiée.

Deux modèles de souris transgéniques, récemment générés (Le et al., 2016), exprimant l'ubiquiline 2^{P497S} ou l'ubiquiline 2^{P506T} humaines, sont les premiers qui ont montré des déficiences de la mémoire, une perte des MNs tout en reproduisant certaines des caractéristiques histologiques de la maladie humaine. Ils pourraient donc être des modèles d'intérêt pour les recherches sur la SLA-DFT. Ces modèles de souris développent une accumulation progressive d'agrégats protéiques à partir de l'âge d'un mois jusqu'à huit mois (stade final). La durée de vie est raccourcie à 246 jours pour les souris exprimant l'ubiquiline 2 portant la mutation P497S et à 305 jours pour celles exprimant l'ubiquiline 2 portant la mutation P506T.

Le modèle de souris généré dans notre laboratoire présente un phénotype plus sévère que ceux générés par d'autres groupes et notamment par Le et ses collaborateurs (2016). En effet, les agrégats et les inclusions sont déjà nombreux à l'âge d'un mois et l'accumulation de signes pathologiques conduit au décès prématuré des souris à l'âge de 76 jours en moyenne. Notre modèle de souris a donc développé des défauts typiques de la SLA et de la SLA-DFT à un âge plus précoce comparé aux modèles de souris transgéniques. Par conséquent, après une caractérisation détaillée, nous concluons que le modèle AAV10-Ub2Mut pourrait être un modèle précieux pour

tester des médicaments pour cette forme spécifique de SLA ainsi que pour étudier *in vivo* les voies d'agrégation.

4) Absence de « pathologie TDP-43 » dans le modèle surexprimant l'ubiquiline 2 humaine mutée

L'une des caractéristiques pathologiques communes retrouvée dans environ 97% des cas de SLA (tant dans les cas sporadiques que dans les formes familiales), est une réduction de la quantité de protéines TDP-43 dans le noyau et son accumulation dans le cytoplasme des MNS spinaux au sein d'inclusions ubiquitinyliées (Neumann *et al.*, 2006 ; Arai *et al.*, 2006 ; Mackenzie *et al.*, 2007 ; Scotter *et al.*, 2015). Cette pathologie n'est par contre pas observée dans les cas de SLA liées à des mutations dans les gènes *SOD1* et *FUS* (Mackenzie *et al.*, 2007 ; Seelaar *et al.*, 2010 ; Urwin *et al.*, 2010 ; Scotter *et al.*, 2015). Cela a conduit à l'hypothèse de l'existence d'un lien entre les altérations de TDP-43 et la pathogenèse de la majorité des cas de SLA (Mackenzie *et al.*, 2007 ; Seelaar *et al.*, 2010 ; Urwin *et al.*, 2010 ; Van Langenhove *et al.*, 2012 ; Scotter *et al.*, 2015).

La « pathologie TDP-43 » est également une caractéristique commune de certaines formes de DFT où elle est observée dans le cerveau des patients lors d'analyses *post-mortem* (Neumann *et al.*, 2006 ; Mackenzie *et al.*, 2007 ; Mackenzie et Neumann, 2016). De plus, Deng et ses collaborateurs (2011) ont détecté la présence de TDP-43 dans les agrégats d'ubiquiline 2 dans la moelle épinière d'un patient porteur de la mutation P506T. En revanche, dans les différents modèles de rongeurs pour la SLA-*UBQLN2*, la présence de TDP-43 dans les inclusions positives à l'ubiquiline 2 est variable. En effet, deux études ont montré que TDP-43 est absente des inclusions d'ubiquiline 2 (Gorrie *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2015) alors que deux autres ont observé sa présence aux âges tardifs de six et huit mois (Cebaloz-Diaz *et al.*, 2015 ; Le *et al.*, 2016).

Bien que nous ayons utilisé deux anticorps différents pour TDP-43, l'un reconnaissant la partie C-terminale et l'autre reconnaissant la partie N-terminale, nous n'avons pas détecté sa présence au sein des inclusions d'ubiquiline 2 dans le cerveau ni dans la moelle épinière des souris injectées avec l'AAV10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut. D'autres recherches sont donc nécessaires pour déterminer quelle est l'implication de TDP-43 dans notre modèle et par extension dans la SLA. Nous pouvons tout de même supposer que les mécanismes liés à la progression de l'âge et/ou à l'accumulation de signes pathologiques pourraient participer à la formation de la « protéinopathie TDP-43 ». En effet, l'absence de la pathologie de TDP-43 chez nos souris pourrait s'expliquer par la rapidité d'apparition de symptômes pathologiques, contrairement à ce qui a été observé dans d'autres modèles murins à des stades plus avancés (Cebaloz-Diaz *et al.*, 2015 ; Le *et al.*, 2016).

Pour vérifier cette hypothèse dans notre modèle, nous pouvons envisager de moduler la maladie des souris surexprimant l'ubiquiline 2 mutée, en modifiant les doses d'AAV injectées. En réduisant la quantité d'ubiquiline 2 surexprimée chez les souris sauvages, nous pourrions diminuer les effets pathologiques et probablement prolonger leur durée de vie. Avec cette méthode nous pourrions donc déterminer la relation entre TDP-43 et l'accumulation d'ubiquiline 2 au cours du temps et éventuellement déterminer son implication dans la SLA et la SLA-DFT.

5) Investigation du mécanisme pathologique de l'ubiquiline 2: gain de fonction et perte de fonction

Les mécanismes par lesquels les mutations de l'ubiquiline 2 provoquent la SLA ne sont pas encore connus. Le knock-out du gène *UBQLN2* chez le rat ne produit aucun phénotype, en excluant d'abord l'hypothèse d'une perte de fonction (Wu et al., 2015). En effet, les mutations de l'ubiquiline 2 semblent entraîner le phénotype SLA à travers un mécanisme de gain de fonction provoquant des conséquences néfastes sur la physiologie cellulaire. Il a déjà été démontré que la surexpression des ubiquilines 2 mutées est responsable de la SLA par une altération de la dégradation protéique via le protéasome, par une perturbation de la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique (DARE) et par une anomalie des processus d'autophagie (Deng et al. 2011 ; Xia et al., 2014 ; Gorrie et al., 2014 ; Chang et Monteiro, 2015 ; Ceballos-Diaz et al., 2015). Ces défauts dans la protéostasie semblent résulter d'une incapacité des protéines mutées à délivrer les protéines poly-ubiquitinylées au protéasome pour être dégradées (Chang et Monteiro, 2015 ; Ceballos-Diaz et al., 2015 ; Osaka et al., 2016). Ce dysfonctionnement pourrait expliquer la présence d'ubiquitine et d'ubiquiline 2 dans les inclusions qui sont observées dans la maladie.

L'accumulation d'inclusions positives pour l'ubiquiline 2 pourrait être interprétée comme un gain de fonction toxique induite par les mutations. D'un autre côté, cela pourrait être considéré comme une perte de fonction, car les protéines mutées ne peuvent accomplir leur rôle physiologique dans les cellules. D'autres études ont d'ailleurs démontré que les mutations de l'ubiquiline 2 dans la SLA-DFT entravent les liaisons de la protéine avec ses partenaires physiologiques, évoquant l'hypothèse d'un mécanisme de perte de fonction (Xia et al., 2014 ; Gilpin et al., 2015 ; Hjerpe et al., 2016).

Afin de comprendre quelle est la contribution de l'ubiquiline 2 mutée dans la pathogénèse de la SLA, nous avons analysé par spectrométrie de masse les protéines co-immunoprécipitées avec l'ubiquiline 2 dans la moelle épinière de nos souris modèles. Une interaction entre l'ubiquiline 2 mutée et les sous-unités du protéasome a été mise en évidence, confirmant ainsi le rôle de

l'ubiquiline 2 dans la voie de la dégradation du protéasome (**figure 54**). Ce constat a été renforcé par l'observation d'une accumulation de protéines ubiquitinyllées dans le cerveau des souris surexprimant l'ubiquiline 2 mutée (**figure 56**). De manière intéressante, les résultats protéomiques ont montré une perte d'interaction de l'ubiquiline 2 mutée avec une protéine nécessaire pour le maintien des structures membranaires et de la forme des neurones, l' α -spectrine (**figure 57**). Plus spécifiquement, la perte d'interaction avec l' α -spectrine a été exclusivement observée après l'immunoprécipitation de l'ubiquiline 2 à partir de lysats protéiques de moelle épinière des souris surexprimant la forme mutée de l'ubiquiline 2.

Afin de confirmer les données obtenues par les analyses de spectrométrie de masse sur l' α -spectrine, nous avons analysé les lysats protéiques de cellules transfectées avec l'ubiquiline 2 sauvage ou mutée. Dans les cellules transfectées avec le plasmide pcDNA-Ub2Mut, nous avons observé une augmentation de la forme complète et des formes clivées de l' α -spectrine (**figure 58**). Nos résultats suggèrent donc que lorsque la liaison entre l' α -spectrine et l'ubiquiline 2 est perdue, l' α -spectrine n'est pas livrée au protéasome pour être dégradée et, par conséquent, s'accumule dans la cellule.

L'ensemble de ces résultats suggère que dans le modèle surexprimant l'ubiquiline 2 mutée, les deux mécanismes pathologiques de gain de fonction et de perte de fonction sont mimés.

Grâce à la mise en place de ce nouveau modèle, des recherches supplémentaires sur les mécanismes moléculaires pourraient être effectuées et donner des informations précieuses sur la pathogénèse de la SLA.

Suite à l'observation de la dérégulation de l' α -spectrine dans ce modèle de souris, nous avons voulu vérifier si l'altération de cette voie était également présente dans les tissus de patients atteints de SLAs. Pour cela, nous avons obtenu des échantillons de cortex de trois témoins et de trois patients provenant de la plateforme de ressources biologiques GIE Neuro-CEB (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière) que nous avons ensuite extraits.

Malheureusement, la qualité de l'extraction protéique ne nous a pas permis d'obtenir des résultats concluants. Nous avons tout de même observé une accumulation d'ubiquiline 2, de la forme complète et des formes clivées de l' α -spectrine chez deux patients, comparés à deux témoins (**figure 59**). Ces données confirment un rôle possible de l'ubiquiline 2 dans les formes sporadiques de la SLA, mais aussi qu'une autre protéine, l' α -spectrine, pourrait être impliquée dans le processus pathologique.

Actuellement aucune mutation du gène *SPTAN1* (codant pour l' α -spectrine) n'a été identifiée dans les patients atteints de SLA, mais des mutations ont été associées à des troubles neurologiques (Fadi et al., 2012). Il reste à déterminer si l'altération de ce gène peut être directement liée à la SLA, ou si celle-ci est la conséquence de l'accumulation de défauts dus à la surexpression de l'ubiquiline 2 ou à d'autres facteurs.

L'étude protéomique nous a également permis d'identifier des protéines qui interagissent spécifiquement avec la forme sauvage de la protéine. Une analyse plus approfondie des protéines et des voies impliquées pourrait aider à mieux comprendre le rôle potentiel de l'ubiquiline 2 dans le cas de la SLA sans mutation de l'ubiquiline 2.

6) Administration du BM chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine sauvage ou mutée comme paradigme pour le test de thérapies

Comme précédemment discuté, plusieurs modèles animaux pour la SLA liée à l'*UBQLN2* ont été générés et caractérisés. Cependant aucun d'entre eux n'a été utilisé pour tester des stratégies thérapeutiques. Pour une validation complète de notre modèle, nous avons décidé de vérifier si les souris injectées avec l'AA10-Ub2 ou l'AAV10-Ub2Mut répondaient à un traitement connu pour réduire les agrégats protéiques.

Le Bleu de Méthylène (BM) est un composé chimique qui inhibe la monoamine oxydase et est utilisé pour le traitement de la malaria, la méthémoglobinémie et comme colorant médical (Ginimuge et Jyothi, 2010).

Il agit comme un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase et de la guanylate cyclase (Ginimuge et Jyothi, 2010). Le BM peut également améliorer la fonction mitochondriale en agissant en tant qu'antioxydant (Kelner et al., 1988). De plus, il a été démontré qu'il est capable de traverser la BHE, lorsqu'il est administré par voie intrapéritonéale (O'Leary et al., 1968). Plusieurs études ont montré que le BM peut avoir des effets neuroprotecteurs pour différents troubles neurologiques, comme la maladie d'Alzheimer (Wischik et al., 1996; Atamna et Kumar, 2010; Medina et al., 2011), la maladie de Parkinson (Wen et al., 2011), l'ischémie cérébrale (Wiklund et al., 2007; Miclescu et al., 2010; Wen et al., 2011), l'amnésie (Riha et al., 2011) et le trouble bipolaire (Naylor et al., 1981; Narsapur et Naylor, 1983; Eroglu et Caglayan, 1997).

Plus spécifiquement, le traitement avec le BM a montré des résultats très encourageants pour réduire le nombre d'agrégats pathologiques et induire l'amélioration du phénotype dans le

cas des maladies d'Alzheimer et de Huntington. En effet, le BM administré à l'apparition des symptômes sur un modèle murin d'Alzheimer s'est avéré neuroprotecteur avec une diminution du nombre et de la taille des plaques amyloïdes dans l'hippocampe et le cortex ainsi qu'une amélioration des fonctions cognitives (Paban et al., 2014). Dans le cas de la maladie de Huntington, le BM est également capable de réduire la formation d'oligomères d'huntingtine et leur accumulation dans les neurones corticaux primaires. Son efficacité a également été démontré *in vivo* chez le modèle murin R6/2 par une augmentation de la survie, un maintien du poids, une amélioration des performances motrices et du phénotype comportemental (Sontag et al., 2012).

L'incubation de BM, à très faible concentration, a été suffisante pour réduire de manière significative les niveaux de protéine tau, à la fois dans des cultures *ex vivo* de cerveau de souris modèle de DFT et dans des modèles cellulaires. Il a modifié les niveaux de plusieurs facteurs de l'autophagie, dont p62, suggérant que le BM est un inducteur puissant de cette voie de dégradation des protéines. Une analyse plus approfondie des voies de signalisation induites par le BM a suggéré un mode d'action similaire à la rapamycine (médicament classiquement utilisé pour induire l'autophagie). Ces résultats ont été récapitulés dans un modèle de souris transgénique de tauopathie lorsque le BM a été administré par voie orale à différentes doses pendant deux semaines. Ces données ont donc appuyé à nouveau l'utilisation du BM comme agent thérapeutique des maladies neurodégénératives (Congdon et al., 2012).

Le BM utilisé sur deux modèles de SLA de *C. elegans* et de poisson-zèbre exprimant les gènes humains mutés de TDP-43 ou de FUS a eu un effet protecteur sur le dysfonctionnement neuronal et le stress oxydatif (Vaccaro et al., 2012). De plus, l'utilisation du BM sur une lignée cellulaire dérivée de neuroblastome (SH-SY5Y) a engendré une diminution de 50% le nombre d'agrégats positifs à TDP-43 (Yamashita et al., 2009).

Malgré certaines propriétés neuroprotectrices, le BM n'a pas entraîné d'effet bénéfique sur le modèle SOD1^{G93A}, sans prévenir l'agrégation de la SOD1 (Lougheed et Turnbull, 2011 ; Audet et al., 2012). Le rôle de cette drogue comme traitement efficace dans tous les contextes de SLA reste donc controversé.

En raison des effets neuroprotecteurs du BM et de sa capacité à réduire la formation d'agrégats protéiques pathologiques et à améliorer les phénotypes cognitifs et moteurs dans diverses maladies neurodégénératives, nous avons choisi de le tester dans notre modèle de SLA-UBQLN2. Après administration intrapéritonéale de BM chez la souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine (sauvage ou mutée), nous avons observé deux effets opposés (**figure 61**). Chez les souris surexprimant la protéine sauvage, traitées avec le BM, le nombre d'agrégats a été réduit par

rapport à celles non traitées (injection de NaCl). Ceci est probablement dû à la morphologie de petite taille et à la localisation intracellulaire des agrégats positifs pour l'ubiquiline 2. En revanche, le traitement n'a pas été assez efficace pour induire une disparition complète des agrégats par rapport aux souris contrôles. De manière surprenante, le BM a augmenté la présence d'inclusions chez les souris surexprimant l'ubiquiline 2 humaine mutée. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que le BM favoriserait la formation d'agrégats protéiques, induits par la surexpression de la forme mutée de l'ubiquiline 2, en créant un environnement favorable à l'agrégation. L'étude des phénomènes observés dans notre modèle de souris aiderait à comprendre pourquoi le BM n'a pas été efficace dans les modèles de SLA (Audet et al., 2012) et a échoué dans l'essai clinique chez les patients atteints de différentes formes d'Alzheimer (Gauthier et al., 2016).

7) Conclusions et perspectives

En conclusion, nous avons généré un modèle valide pour l'étude de la SLA liée à l'*UBQLN2*, via le transfert de gène à l'aide d'AAV. Nous avons caractérisé ce modèle de façon approfondie, en analysant ses altérations histologiques, ses symptômes phénotypiques et comportementaux. Nous avons essayé de comprendre le mécanisme par lequel la mutation de l'ubiquiline 2 est capable d'induire la maladie et nous avons testé l'effet d'un médicament approuvé par la FDA contre la formation d'agrégats. Tous les résultats obtenus confirment que ce modèle pourrait être utile pour comprendre le mécanisme pathologique responsable de la maladie, mais aussi pour tester rapidement l'effet de possibles agents thérapeutiques sur la formation des agrégats.

L'utilisation du vecteur AAV représente un outil polyvalent permettant de moduler la maladie et d'analyser de nombreux aspects encore inconnus, telle que la contribution spécifique de certains types cellulaires, de tissus ou d'organes dans la pathogénèse. Avec cette méthode, nous pourrions ainsi suivre et étudier la cinétique de formation des agrégats *in vivo*.

La génération de ce modèle et des autres modèles pour la SLA-*UBQLN2* ainsi que les études du rôle physiologique de l'ubiquiline 2, sont des étapes clés dans la compréhension des mécanismes responsables de la maladie.

L'identification des mécanismes impliqués aidera à développer de nouvelles thérapies et les modèles qui récapitulent fidèlement les aspects clés de la maladie seront des outils précieux pour atteindre ces objectifs.

En perspective, ce modèle sera utilisé pour tester de nouvelles thérapies. Comme première étape, un criblage de molécules thérapeutiques *in vitro* sera effectué pour identifier des candidats qui seront évalués *in vivo*. Plus concrètement, un modèle cellulaire sera produit par transduction de MNs dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) à l'aide de vecteurs AAV10

exprimant l'ubiquiline 2 mutée. Un criblage de composés thérapeutiques sera ensuite effectué pour déterminer leur capacité à réduire les agrégats positifs à l'ubiquiline 2. Une fois identifiés, les composés efficaces seront administrés chez les souris injectées avec l'AAV10-Ub2Mut.

BIBLIOGRAPHIE

Articles scientifiques:

Abe, K, Pan, LH, Watanabe, M, Kato, T and Itoyama, Y (1995). Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* **199**: 152–154.

Abe, K, Pan, LH, Watanabe, M, Konno, H, Kato, T and Itoyama, Y (1997). Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Res.* **19**: 124–128.

Abe, K and Warita, H (1999). [Molecular mechanism of ALS and a possible gene therapy]. *Rinsho Shinkeigaku* **39**: 68–69.

Aberle, H, Bauer, A, Stappert, J, Kispert, A and Kemler, R (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**: 3797–3804.

Ahlberg, J and Glaumann, H (1985). Uptake--microautophagy--and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Exp. Mol. Pathol.* **42**: 78–88.

Al-Chalabi, A and Hardiman, O (2013). The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* **9**: 617–628.

Al-Chalabi, A, Jones, A, Troakes, C, King, A, Al-Sarraj, S and van den Berg, LH (2012). The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **124**: 339–352.

Allen, MJ, Lacroix, JJ, Ramachandran, S, Capone, R, Whitlock, JL, Ghadge, GD, *et al.* (2012). Mutant SOD1 forms ion channel: implications for ALS pathophysiology. *Neurobiol. Dis.* **45**: 831–838.

Alsultan, A A, Waller, R, Heath, P R, Kirby, J (2016). The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease* **6**: 49–64.

Aman, P, Panagopoulos, I, Lassen, C, Fioretos, T, Mencinger, M, Toresson, H, *et al.* (1996). Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics* **37**: 1–8.

Ambikairajah, A, Devenney, E, Flanagan, E, Yew, B, Mioshi, E, Kiernan, MC, *et al.* (2014). A visual MRI atrophy rating scale for the amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia continuum. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **15**: 226–234.

Andersen, PM, Nilsson, P, Ala-Hurula, V, Keränen, ML, Tarvainen, I, Haltia, T, *et al.* (1995). Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **10**: 61–66.

Arai, T, Hasegawa, M, Akiyama, H, Ikeda, K, Nonaka, T, Mori, H, *et al.* (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**: 602–611.

Arai, T, Hasegawa, M, Nonaka, T, Kametani, F, Yamashita, M, Hosokawa, M, *et al.* (2010). Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology* **30**: 170–181.

Armbruster, N, Lattanzi, A, Jeavons, M, Van Wittenberghe, L, Gjata, B, Marais, T, *et al.* (2016). Efficacy and biodistribution analysis of intracerebroventricular administration of an optimized scAAV9-SMN1 vector in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Mol Ther Methods Clin Dev* **3**: 16060.

Arnold, WD and Burghes, AHM (2013). Spinal muscular atrophy: development and implementation of potential treatments. *Ann. Neurol.* **74**: 348–362.

Arthur, KC, Calvo, A, Price, TR, Geiger, JT, Chiò, A and Traynor, BJ (2016). Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nat Commun* **7**: 12408.

- Ash, PEA, Zhang, Y-J, Roberts, CM, Saldi, T, Hutter, H, Buratti, E, *et al.* (2010). Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*. *Hum. Mol. Genet.* **19**: 3206–3218.
- Atamna, H and Kumar, R (2010). Protective role of methylene blue in Alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase. *J. Alzheimers Dis.* **20 Suppl 2**: S439-452.
- Audet, J-N, Soucy, G and Julien, J-P (2012). Methylene blue administration fails to confer neuroprotection in two amyotrophic lateral sclerosis mouse models. *Neuroscience* **209**: 136–143.
- Avilés, EC and Stoeckli, ET (2016). Canonical wnt signaling is required for commissural axon guidance. *Dev Neurobiol* **76**: 190–208.
- Ayers, JI, Fromholt, SE, O'Neal, VM, Diamond, JH and Borchelt, DR (2016). Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta Neuropathol.* **131**: 103–114.
- Azzouz, M, Hottinger, A, Paterna, JC, Zurn, AD, Aebischer, P and Büeler, H (2000). Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 803–811.
- Azzouz, M, Ralph, GS, Storkebaum, E, Walmsley, LE, Mitrophanous, KA, Kingsman, SM, *et al.* (2004). VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* **429**: 413–417.
- Ball, LJ, Kühne, R, Schneider-Mergener, J and Oschkinat, H (2005). Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**: 2852–2869.
- Beghi, E, Bendotti, C and Mennini, T (2006). New ideas for therapy in ALS: critical considerations. *Amyotroph Lateral Scler* **7**: 126–127; discussion 127.
- Bennett, EJ, Bence, NF, Jayakumar, R and Kopito, RR (2005). Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol. Cell* **17**: 351–365.
- Bensimon, G, Lacomblez, L and Meininger, V (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N. Engl. J. Med.* **330**: 585–591.
- Biferi, MG, Cohen-Tannoudji, M, Cappelletto, A, Giroux, B, Roda, M, Astord, S, *et al.* (2017). A New AAV10-U7-Mediated Gene Therapy Prolongs Survival and Restores Function in an ALS Mouse Model. *Mol. Ther.* **25**: 2038–2052.
- Bogdanov, M, Brown, RH, Matson, W, Smart, R, Hayden, D, O'Donnell, H, *et al.* (2000). Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic. Biol. Med.* **29**: 652–658.
- Boillée, S and Cleveland, DW (2004). Gene therapy for ALS delivers. *Trends Neurosci.* **27**: 235–238.
- Borasio, GD, Robberecht, W, Leigh, PN, Emile, J, Guiloff, RJ, Jerusalem, F, *et al.* (1998). A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* **51**: 583–586.
- Borel, F, Gernoux, G, Cardozo, B, Metterville, JP, Toro Cabreja, GC, Song, L, *et al.* (2016). Therapeutic rAAVrh10 Mediated SOD1 Silencing in Adult SOD1(G93A) Mice and Nonhuman Primates. *Hum. Gene Ther.* **27**: 19–31.
- Boylan, K (2015). Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin* **33**: 807–830.
- Bozik, ME, Mather, JL, Kramer, WG, Gribkoff, VK and Ingersoll, EW (2011). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of KNS-760704 (dexamipexole) in healthy adult subjects. *J Clin Pharmacol* **51**: 1177–1185.
- Braff, DL, Geyer, MA and Swerdlow, NR (2001). Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl.)* **156**: 234–258.

- Brettschneider, J, Del Tredici, K, Toledo, JB, Robinson, JL, Irwin, DJ, Grossman, M, *et al.* (2013). Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **74**: 20–38.
- Brettschneider, J, Van Deerlin, VM, Robinson, JL, Kwong, L, Lee, EB, Ali, YO, *et al.* (2012). Pattern of ubiquilin pathology in ALS and FTLD indicates presence of C9ORF72 hexanucleotide expansion. *Acta Neuropathol.* **123**: 825–839.
- Brinster, RL, Allen, JM, Behringer, RR, Gelinas, RE and Palmiter, RD (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 836–840.
- Broekman, MLD, Baek, RC, Comer, LA, Fernandez, JL, Seyfried, TN and Sena-Esteves, M (2007). Complete correction of enzymatic deficiency and neurochemistry in the GM1-gangliosidosis mouse brain by neonatal adeno-associated virus-mediated gene delivery. *Mol. Ther.* **15**: 30–37.
- Brown, JW, Bullitt, E, Sriswasdi, S, Harper, S, Speicher, DW and McKnight, CJ (2015). The Physiological Molecular Shape of Spectrin: A Compact Supercoil Resembling a Chinese Finger Trap. *PLoS Comput. Biol.* **11**: e1004302.
- Brown, R H, and Al-Chalabi, A (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* **377**: 162-72.
- Büning, H, Perabo, L, Coutelle, O, Quadt-Humme, S and Hallek, M (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* **10**: 717–733.
- Buratti, E and Baralle, FE (2008). Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front. Biosci.* **13**: 867–878.
- Buratti, E, Brindisi, A, Giombi, M, Tisminetzky, S, Ayala, YM and Baralle, FE (2005). TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J. Biol. Chem.* **280**: 37572–37584.
- Burghes, AHM and Beattie, CE (2009). Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* **10**: 597–609.
- Cairns, NJ, Neumann, M, Bigio, EH, Holm, IE, Troost, D, Hatanpaa, KJ, *et al.* (2007). TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. *Am. J. Pathol.* **171**: 227–240.
- Carter, RJ, Lione, LA, Humby, T, Mangiarini, L, Mahal, A, Bates, GP, *et al.* (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington’s disease mutation. *J. Neurosci.* **19**: 3248–3257.
- Ceballos-Diaz, C, Rosario, AM, Park, H-J, Chakrabarty, P, Sacino, A, Cruz, PE, *et al.* (2015). Viral expression of ALS-linked ubiquilin-2 mutants causes inclusion pathology and behavioral deficits in mice. *Mol Neurodegener* **10**: 25.
- Chang, L and Monteiro, MJ (2015). Defective Proteasome Delivery of Polyubiquitinated Proteins by Ubiquilin-2 Proteins Containing ALS Mutations. *PLoS ONE* **10**: e0130162.
- Chang, Y-F, Imam, JS and Wilkinson, MF (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 51–74.
- Chattopadhyay, M, Durazo, A, Sohn, SH, Strong, CD, Gralla, EB, Whitelegge, JP, *et al.* (2008). Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 18663–18668.
- Chen, S, Zhang, X, Song, L and Le, W (2012). Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol.* **22**: 110–116.
- Chew, J, Gendron, TF, Prudencio, M, Sasaguri, H, Zhang, Y-J, Castanedes-Casey, M, *et al.* (2015). Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science* **348**: 1151–1154.
- Ciesler, J and Sari, Y (2013). Neurotrophic Peptides: Potential Drugs for Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Alzheimer’s disease. *Open J Neurosci* **3**.

- Ciura, S, Lattante, S, Le Ber, I, Latouche, M, Tostivint, H, Brice, A, *et al.* (2013). Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **74**: 180–187.
- Congdon, EE, Wu, JW, Myeku, N, Figueroa, YH, Herman, M, Marinec, PS, *et al.* (2012). Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy* **8**: 609–622.
- Contestabile, A (2011). Amyotrophic lateral sclerosis: from research to therapeutic attempts and therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.* **18**: 5655–5665.
- Corcia, P, Valdmanis, P, Millecamps, S, Lionnet, C, Blasco, H, Mouzat, K, *et al.* (2012). Phenotype and genotype analysis in amyotrophic lateral sclerosis with TARDBP gene mutations. *Neurology* **78**: 1519–1526.
- Corrado, L, Del Bo, R, Castellotti, B, Ratti, A, Cereda, C, Penco, S, *et al.* (2010). Mutations of FUS gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Med. Genet.* **47**: 190–194.
- Couratier, P, Marin, B, Lautrette, G, Nicol, M and Preux, P-M (2014). [Epidemiology, clinical spectrum of ALS and differential diagnoses]. *Presse Med* **43**: 538–548.
- Cudkowicz, ME, Shefner, JM, Simpson, E, Grasso, D, Yu, H, Zhang, H, *et al.* (2008). Arimoclomol at dosages up to 300 mg/day is well tolerated and safe in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **38**: 837–844.
- Cuervo, AM, Stefanis, L, Fredenburg, R, Lansbury, PT and Sulzer, D (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* **305**: 1292–1295.
- Damiano, M, Starkov, AA, Petri, S, Kipiani, K, Kiaei, M, Mattiazzi, M, *et al.* (2006). Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J. Neurochem.* **96**: 1349–1361.
- Daoud, H, Suhail, H, Szuto, A, Camu, W, Salachas, F, Meininger, V, *et al.* (2012). UBQLN2 mutations are rare in French and French-Canadian amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* **33**: 2230.e1–2230.e5.
- Dayton, RD, Wang, DB and Klein, RL (2012). The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. *Expert Opin Biol Ther* **12**: 757–766.
- de Castro, IP, Costa, AC, Celardo, I, Tufi, R, Dinsdale, D, Loh, SHY, *et al.* (2013). Drosophila ref(2)P is required for the parkin-mediated suppression of mitochondrial dysfunction in pink1 mutants. *Cell Death Dis* **4**: e873.
- De Duve, C and Wattiaux, R (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* **28**: 435–492.
- Dégion, N, Tseng, JL, Bensadoun, JC, Zurn, AD, Arsenijevic, Y, Pereira de Almeida, L, *et al.* (2000). Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* **11**: 179–190.
- DeJesus-Hernandez, M, Mackenzie, IR, Boeve, BF, Boxer, AL, Baker, M, Rutherford, NJ, *et al.* (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* **72**: 245–256.
- DeLoach, A, Cozart, M, Kiaei, A and Kiaei, M (2015). A retrospective review of the progress in amyotrophic lateral sclerosis drug discovery over the last decade and a look at the latest strategies. *Expert Opin Drug Discov* **10**: 1099–1118.
- Deng, H-X, Chen, W, Hong, S-T, Boycott, KM, Gorrie, GH, Siddique, N, *et al.* (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* **477**: 211–215.
- Di Carlo, M, Giacomazza, D, Picone, P, Nuzzo, D and San Biagio, PL (2012). Are oxidative stress and mitochondrial dysfunction the key players in the neurodegenerative diseases? *Free Radic. Res.* **46**: 1327–1338.

- Dimos, JT, Rodolfa, KT, Niakan, KK, Weisenthal, LM, Mitsumoto, H, Chung, W, *et al.* (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**: 1218–1221.
- Ding, W, Zhang, L, Yan, Z and Engelhardt, JF (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther.* **12**: 873–880.
- Dominguez, E, Marais, T, Chatauret, N, Benkhelifa-Ziyat, S, Duque, S, Ravassard, P, *et al.* (2011). Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 681–693.
- Donnelly, CJ, Zhang, P-W, Pham, JT, Haeusler, AR, Heusler, AR, Mistry, NA, *et al.* (2013). RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron* **80**: 415–428.
- Dormann, D, Capell, A, Carlson, AM, Shankaran, SS, Rodde, R, Neumann, M, *et al.* (2009). Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin. *J. Neurochem.* **110**: 1082–1094.
- Dormann, D and Haass, C (2013). Fused in sarcoma (FUS): an oncogene goes awry in neurodegeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* **56**: 475–486.
- Dunkel, P, Chai, CL, Sperlágh, B, Huleatt, PB and Mátyus, P (2012). Clinical utility of neuroprotective agents in neurodegenerative diseases: current status of drug development for Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases, and amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* **21**: 1267–1308.
- Dupuis, L (2009). Oxidative stress sensitivity in ALS muscle cells. *Exp. Neurol.* **220**: 219–223.
- Duque, SI, Arnold, WD, Odermatt, P, Li, X, Porensky, PN, Schmelzer, L, *et al.* (2015). A large animal model of spinal muscular atrophy and correction of phenotype. *Ann. Neurol.* **77**: 399–414.
- Duque, S, Joussemet, B, Riviere, C, Marais, T, Dubreil, L, Douar, A-M, *et al.* (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol. Ther.* **17**: 1187–1196.
- Edens, BM, Yan, J, Miller, N, Deng, H-X, Siddique, T and Ma, YC (2017). A novel ALS-associated variant in UBQLN4 regulates motor axon morphogenesis. *Elife* **6**.
- Eroğlu, L and Çağlayan, B (1997). Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. *Pharmacol. Res.* **36**: 381–385.
- Fahed, AC, McDonough, B, Gouvion, CM, Newell, KL, Dure, LS, Bebin, M, *et al.* (2014). UBQLN2 mutation causing heterogeneous X-linked dominant neurodegeneration. *Ann. Neurol.* **75**: 793–798.
- Farg, MA, Sundaramoorthy, V, Sultana, JM, Yang, S, Atkinson, RAK, Levina, V, *et al.* (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum. Mol. Genet.* **23**: 3579–3595.
- Farré, J-C and Subramani, S (2004). Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol.* **14**: 515–523.
- Fecto, F and Siddique, T (2012). UBQLN2/P62 cellular recycling pathways in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Muscle Nerve* **45**: 157–162.
- Fecto, F, Yan, J, Vemula, SP, Liu, E, Yang, Y, Chen, W, *et al.* (2011). SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* **68**: 1440–1446.
- Federici, T and Boulis, NM (2006). Gene-based treatment of motor neuron diseases. *Muscle Nerve* **33**: 302–323.
- Fedorova, E, Battini, L, Prakash-Cheng, A, Marras, D and Gusella, GL (2006). Lentiviral gene delivery to CNS by spinal intrathecal administration to neonatal mice. *J Gene Med* **8**: 414–424.

- Ferraiuolo, L, Kirby, J, Grierson, AJ, Sendtner, M and Shaw, PJ (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* **7**: 616–630.
- Ferrante, RJ, Browne, SE, Shinobu, LA, Bowling, AC, Baik, MJ, MacGarvey, U, *et al.* (1997). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **69**: 2064–2074.
- Ferrante, RJ, Kowall, NW, Cipolloni, PB, Storey, E and Beal, MF (1993). Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp. Neurol.* **119**: 46–71.
- Ferrari, FK, Samulski, T, Shenk, T and Samulski, RJ (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **70**: 3227–3234.
- Ferrari, R, Kapogiannis, D, Huey, ED and Momeni, P (2011). FTD and ALS: a tale of two diseases. *Curr Alzheimer Res* **8**: 273–294.
- Filali, M, Lalonde, R and Rivest, S (2011). Sensorimotor and cognitive functions in a SOD1(G37R) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Behav. Brain Res.* **225**: 215–221.
- Finley, D (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* **78**: 477–513.
- Fischer, LR, Culver, DG, Tennant, P, Davis, AA, Wang, M, Castellano-Sanchez, A, *et al.* (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* **185**: 232–240.
- Fisher, KJ, Gao, GP, Weitzman, MD, DeMatteo, R, Burda, JF and Wilson, JM (1996). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J. Virol.* **70**: 520–532.
- Foust, KD, Nurre, E, Montgomery, CL, Hernandez, A, Chan, CM and Kaspar, BK (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotechnol.* **27**: 59–65.
- Foust, KD, Salazar, DL, Likhite, S, Ferraiuolo, L, Ditsworth, D, Ilieva, H, *et al.* (2013). Therapeutic AAV9-mediated suppression of mutant SOD1 slows disease progression and extends survival in models of inherited ALS. *Mol. Ther.* **21**: 2148–2159.
- Franz, CK, Federici, T, Yang, J, Backus, C, Oh, SS, Teng, Q, *et al.* (2009). Intraspinal cord delivery of IGF-I mediated by adeno-associated virus 2 is neuroprotective in a rat model of familial ALS. *Neurobiol. Dis.* **33**: 473–481.
- Frey, D, Schneider, C, Xu, L, Borg, J, Spooren, W and Caroni, P (2000). Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J. Neurosci.* **20**: 2534–2542.
- Friedlander, RM (2003). Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1365–1375.
- Gami, P, Murray, C, Schottlaender, L, Bettencourt, C, De Pablo Fernandez, E, Mudanohwo, E, *et al.* (2015). A 30-unit hexanucleotide repeat expansion in C9orf72 induces pathological lesions with dipeptide-repeat proteins and RNA foci, but not TDP-43 inclusions and clinical disease. *Acta Neuropathol.* **130**: 599–601.
- Gao, G, Vandenberghe, LH, Alvira, MR, Lu, Y, Calcedo, R, Zhou, X, *et al.* (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J. Virol.* **78**: 6381–6388.
- Gauthier, S, Feldman, HH, Schneider, LS, Wilcock, GK, Frisoni, GB, Hardlund, JH, *et al.* (2016). Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *Lancet* **388**: 2873–2884.
- Geetha, T, Vishwaprakash, N, Sycheva, M and Babu, JR (2012). Sequestosome 1/p62: across diseases. *Biomarkers* **17**: 99–103.
- Gellera, C, Tiloca, C, Del Bo, R, Corrado, L, Pensato, V, Agostini, J, *et al.* (2013). Ubiquilin 2 mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **84**: 183–187.

- Gijselinck, I, Van Langenhove, T, van der Zee, J, Sleegers, K, Philtjens, S, Kleinberger, G, *et al.* (2012). A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol* **11**: 54–65.
- Gilpin, KM, Chang, L and Monteiro, MJ (2015). ALS-linked mutations in ubiquilin-2 or hnRNPA1 reduce interaction between ubiquilin-2 and hnRNPA1. *Hum. Mol. Genet.* **24**: 2565–2577.
- Ginimuge, PR and Jyothi, SD (2010). Methylene blue: revisited. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* **26**: 517–520.
- Giordana, MT, Piccinini, M, Grifoni, S, De Marco, G, Vercellino, M, Magistrello, M, *et al.* (2010). TDP-43 redistribution is an early event in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol.* **20**: 351–360.
- Giordano, A, Galderisi, U and Marino, IR (2007). From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* **211**: 27–35.
- Gleason, CE, Ordureau, A, Gourlay, R, Arthur, JSC and Cohen, P (2011). Polyubiquitin binding to optineurin is required for optimal activation of TANK-binding kinase 1 and production of interferon β . *J. Biol. Chem.* **286**: 35663–35674.
- Glicksman, MA (2011). The preclinical discovery of amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Expert Opin Drug Discov* **6**: 1127–1138.
- Goldberg, AL (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**: 895–899.
- González-Pérez, P, Lu, Y, Chian, R-J, Sapp, PC, Tanzi, RE, Bertram, L, *et al.* (2012). Association of UBQLN1 mutation with Brown-Vialetto-Van Laere syndrome but not typical ALS. *Neurobiol. Dis.* **48**: 391–398.
- Gordon, PH (2013). Amyotrophic Lateral Sclerosis: An update for 2013 Clinical Features, Pathophysiology, Management and Therapeutic Trials. *Aging Dis* **4**: 295–310.
- Gorrie, GH, Fecto, F, Radzicki, D, Weiss, C, Shi, Y, Dong, H, *et al.* (2014). Dendritic spinopathy in transgenic mice expressing ALS/dementia-linked mutant UBQLN2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: 14524–14529.
- Graffmo, KS, Forsberg, K, Bergh, J, Birve, A, Zetterström, P, Andersen, PM, *et al.* (2013). Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **22**: 51–60.
- Gribkoff, VK and Bozik, ME (2008). KNS-760704 [(6R)-4,5,6,7-tetrahydro-N6-propyl-2, 6-benzothiazole-diamine dihydrochloride monohydrate] for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurosci Ther* **14**: 215–226.
- Grimm, D, Kay, MA and Kleinschmidt, JA (2003). Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol. Ther.* **7**: 839–850.
- Guo, H, Lai, L, Butchbach, MER, Stockinger, MP, Shan, X, Bishop, GA, *et al.* (2003). Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum. Mol. Genet.* **12**: 2519–2532.
- Gurney, ME, Pu, H, Chiu, AY, Dal Canto, MC, Polchow, CY, Alexander, DD, *et al.* (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**: 1772–1775.
- Haeusler, AR, Donnelly, CJ and Rothstein, JD (2016). The expanding biology of the C9orf72 nucleotide repeat expansion in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**: 383–395.
- Haidet-Phillips, AM, Hester, ME, Miranda, CJ, Meyer, K, Braun, L, Frakes, A, *et al.* (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat. Biotechnol.* **29**: 824–828.

- Hamdan, FF, Saitsu, H, Nishiyama, K, Gauthier, J, Dobrzeniecka, S, Spiegelman, D, *et al.* (2012). Identification of a novel in-frame de novo mutation in SPTAN1 in intellectual disability and pontocerebellar atrophy. *Eur. J. Hum. Genet.* **20**: 796–800.
- Hanisch, F, Skudlarek, A, Berndt, J and Kornhuber, ME (2015). Characteristics of pain in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav* **5**: e00296.
- Hara, T, Nakamura, K, Matsui, M, Yamamoto, A, Nakahara, Y, Suzuki-Migishima, R, *et al.* (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**: 885–889.
- Hardiman, O and van den Berg, LH (2017). Edaravone: a new treatment for ALS on the horizon? *Lancet Neurol* **16**: 490–491.
- Henkel, JS, Beers, DR, Zhao, W and Appel, SH (2009). Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol* **4**: 389–398.
- Henkel, JS, Engelhardt, JI, Siklós, L, Simpson, EP, Kim, SH, Pan, T, *et al.* (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann. Neurol.* **55**: 221–235.
- Hensley, K, Mhatre, M, Mou, S, Pye, QN, Stewart, C, West, M, *et al.* (2006). On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid. Redox Signal.* **8**: 2075–2087.
- Hermens, WT, ter Brake, O, Dijkhuizen, PA, Sonnemans, MA, Grimm, D, Kleinschmidt, JA, *et al.* (1999). Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. *Hum. Gene Ther.* **10**: 1885–1891.
- Hershko, A and Ciechanover, A (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425–479.
- Hicks, GG, Singh, N, Nashabi, A, Mai, S, Bozek, G, Klewes, L, *et al.* (2000). Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nat. Genet.* **24**: 175–179.
- Hjerpe, R, Bett, JS, Keuss, MJ, Solovyova, A, McWilliams, TG, Johnson, C, *et al.* (2016). UBQLN2 Mediates Autophagy-Independent Protein Aggregate Clearance by the Proteasome. *Cell* **166**: 935–949.
- Hortobágyi, T, Troakes, C, Nishimura, AL, Vance, C, van Swieten, JC, Seelaar, H, *et al.* (2011). Optineurin inclusions occur in a minority of TDP-43 positive ALS and FTLD-TDP cases and are rarely observed in other neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* **121**: 519–527.
- Huang, C-C, Bose, JK, Majumder, P, Lee, K-H, Huang, J-TJ, Huang, JK, *et al.* (2014). Metabolism and mis-metabolism of the neuropathological signature protein TDP-43. *J. Cell. Sci.* **127**: 3024–3038.
- Hukema, RK, Riemsdijk, FW, Melhem, S, van der Linde, HC, Severijnen, L-AW, Edbauer, D, *et al.* (2014). A new inducible transgenic mouse model for C9orf72-associated GGGGCC repeat expansion supports a gain-of-function mechanism in C9orf72-associated ALS and FTD. *Acta Neuropathol Commun* **2**: 166.
- Igaz, LM, Kwong, LK, Xu, Y, Truax, AC, Uryu, K, Neumann, M, *et al.* (2008). Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Pathol.* **173**: 182–194.
- Iguchi, Y, Katsuno, M, Ikenaka, K, Ishigaki, S and Sobue, G (2013). Amyotrophic lateral sclerosis: an update on recent genetic insights. *J. Neurol.* **260**: 2917–2927.
- Ito, H, Nakamura, M, Komure, O, Ayaki, T, Wate, R, Maruyama, H, *et al.* (2011). Clinicopathologic study on an ALS family with a heterozygous E478G optineurin mutation. *Acta Neuropathol.* **122**: 223–229.

Ito, H, Wate, R, Zhang, J, Ohnishi, S, Kaneko, S, Ito, H, *et al.* (2008). Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Exp. Neurol.* **213**: 448–455.

Jaarsma, D, Haasdijk, ED, Grashorn, JA, Hawkins, R, van Duijn, W, Verspaget, HW, *et al.* (2000). Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol. Dis.* **7**: 623–643.

Jackson, KL, Lin, W-L, Miriyala, S, Dayton, RD, Panchatcharam, M, McCarthy, KJ, *et al.* (2017). p62 Pathology Model in the Rat Substantia Nigra with Filamentous Inclusions and Progressive Neurodegeneration. *PLoS ONE* **12**: e0169291.

Jiang, H-Q, Ren, M, Jiang, H-Z, Wang, J, Zhang, J, Yin, X, *et al.* (2014). Guanabenz delays the onset of disease symptoms, extends lifespan, improves motor performance and attenuates motor neuron loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* **277**: 132–138.

Jiang, J, Zhu, Q, Gendron, TF, Saberi, S, McAlonis-Downes, M, Seelman, A, *et al.* (2016). Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron* **90**: 535–550.

Kabashi, E, Lin, L, Tradewell, ML, Dion, PA, Bercier, V, Bourgouin, P, *et al.* (2010). Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum. Mol. Genet.* **19**: 671–683.

Kabashi, E, Valdmanis, PN, Dion, P, Spiegelman, D, McConkey, BJ, Vande Velde, C, *et al.* (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* **40**: 572–574.

Kalmar, B, Novoselov, S, Gray, A, Cheetham, ME, Margulis, B and Greensmith, L (2008). Late stage treatment with arimoclomol delays disease progression and prevents protein aggregation in the SOD1 mouse model of ALS. *J. Neurochem.* **107**: 339–350.

Kamada, M, Izumi, Y, Ayaki, T, Nakamura, M, Kagawa, S, Kudo, E, *et al.* (2014). Clinicopathologic features of autosomal recessive amyotrophic lateral sclerosis associated with optineurin mutation. *Neuropathology* **34**: 64–70.

Kaspar, BK, Lladó, J, Sherkat, N, Rothstein, JD and Gage, FH (2003). Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* **301**: 839–842.

Kaushik, S and Cuervo, AM (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* **22**: 407–417.

Kawahara, Y and Kwak, S (2005). Excitotoxicity and ALS: what is unique about the AMPA receptors expressed on spinal motor neurons? *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **6**: 131–144.

Kaye, FJ and Shows, TB (2000). Assignment of ubiquilin2 (UBQLN2) to human chromosome xp11. 23-->p11.1 by GeneBridge radiation hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* **89**: 116–117.

Keating, DJ (2008). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* **104**: 298–305.

Kelner, MJ, Bagnell, R, Hale, B and Alexander, NM (1988). Methylene blue competes with paraquat for reduction by flavo-enzymes resulting in decreased superoxide production in the presence of heme proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**: 422–426.

Kennel, PF, Finiels, F, Revah, F and Mallet, J (1996). Neuromuscular function impairment is not caused by motor neurone loss in FALS mice: an electromyographic study. *Neuroreport* **7**: 1427–1431.

Kieran, D, Kalmar, B, Dick, JRT, Riddoch-Contreras, J, Burnstock, G and Greensmith, L (2004). Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat. Med.* **10**: 402–405.

Kim, SU and de Vellis, J (2009). Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *J. Neurosci. Res.* **87**: 2183–2200.

Kim, T-Y, Kim, E, Yoon, SK and Yoon, J-B (2008). Herp enhances ER-associated protein degradation by recruiting ubiquilins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**: 741–746.

Kino, Y, Washizu, C, Kurosawa, M, Yamada, M, Miyazaki, H, Akagi, T, *et al.* (2015). FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* **3**: 24.

Kleiger, G and Mayor, T (2014). Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol.* **24**: 352–359.

Kleijnen, MF, Shih, AH, Zhou, P, Kumar, S, Soccio, RE, Kedersha, NL, *et al.* (2000). The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol. Cell* **6**: 409–419.

Klein, RL, Dayton, RD, Diaczynsky, CG and Wang, DB (2010). Pronounced microgliosis and neurodegeneration in aged rats after tau gene transfer. *Neurobiol. Aging* **31**: 2091–2102.

Klein, RL, Dayton, RD, Tatom, JB, Diaczynsky, CG and Salvatore, MF (2008). Tau expression levels from various adeno-associated virus vector serotypes produce graded neurodegenerative disease states. *Eur. J. Neurosci.* **27**: 1615–1625.

Komatsu, M, Kageyama, S and Ichimura, Y (2012). p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacol. Res.* **66**: 457–462.

Komatsu, M, Waguri, S, Chiba, T, Murata, S, Iwata, J, Tanida, I, *et al.* (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**: 880–884.

Koppers, M, Blokhuis, AM, Westeneng, H-J, Terpstra, ML, Zundel, CAC, Vieira de Sá, R, *et al.* (2015). C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann. Neurol.* **78**: 426–438.

Kuhle, J, Lindberg, RLP, Regeniter, A, Mehling, M, Steck, AJ, Kappos, L, *et al.* (2009). Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **16**: 771–774.

Kumar, V, Islam, A, Hassan, MI and Ahmad, F (2016). Therapeutic progress in amyotrophic lateral sclerosis—beginning to learning. *Eur J Med Chem* **121**: 903–917.

Kuusisto, E, Salminen, A and Alafuzoff, I (2001). Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport* **12**: 2085–2090.

Kwiatkowski, TJ, Bosco, DA, Leclerc, AL, Tamrazian, E, Vanderburg, CR, Russ, C, *et al.* (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**: 1205–1208.

Kwok, CT, Morris, A and de Belleruche, JS (2014). Sequestosome-1 (SQSTM1) sequence variants in ALS cases in the UK: prevalence and coexistence of SQSTM1 mutations in ALS kindred with PDB. *Eur. J. Hum. Genet.* **22**: 492–496.

Kwon, J, Han, E, Bui, C-B, Shin, W, Lee, J, Lee, S, *et al.* (2012). Assurance of mitochondrial integrity and mammalian longevity by the p62-Keap1-Nrf2-Nqo1 cascade. *EMBO Rep.* **13**: 150–156.

Lagier-Tourenne, C, Baughn, M, Rigo, F, Sun, S, Liu, P, Li, H-R, *et al.* (2013). Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**: E4530–E4539.

Lai, EC, Felice, KJ, Festoff, BW, Gawel, MJ, Gelinis, DF, Kratz, R, *et al.* (1997). Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* **49**: 1621–1630.

- Lanka, V, Wieland, S, Barber, J and Cudkowicz, M (2009). Arimocloamol: a potential therapy under development for ALS. *Expert Opin Investig Drugs* **18**: 1907–1918.
- Lattante, S, de Calbiac, H, Le Ber, I, Brice, A, Ciura, S and Kabashi, E (2015). Sqstm1 knock-down causes a locomotor phenotype ameliorated by rapamycin in a zebrafish model of ALS/FTLD. *Hum. Mol. Genet.* **24**: 1682–1690.
- Lattante, S, Rouleau, GA and Kabashi, E (2013). TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Hum. Mutat.* **34**: 812–826.
- Layfield, R and Hocking, LJ (2004). SQSTM1 and Paget's disease of bone. *Calcif. Tissue Int.* **75**: 347–357.
- Le Bec, C and Douar, AM (2006). Gene therapy progress and prospects--vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors. *Gene Ther.* **13**: 805–813.
- Le Ber, I, Camuzat, A, Guerreiro, R, Bouya-Ahmed, K, Bras, J, Nicolas, G, *et al.* (2013). SQSTM1 mutations in French patients with frontotemporal dementia or frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol* **70**: 1403–1410.
- Lee, K-W, Kim, H-J, Sung, J-J, Park, K-S and Kim, M (2002). Defective neurite outgrowth in aphidicolin/cAMP-induced motor neurons expressing mutant Cu/Zn superoxide dismutase. *Int. J. Dev. Neurosci.* **20**: 521–526.
- Lee, M and Shin, J (2011). Triage of oxidation-prone proteins by Sqstm1/p62 within the mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **413**: 122–127.
- Le, NTT, Chang, L, Kovlyagina, I, Georgiou, P, Safren, N, Braunstein, KE, *et al.* (2016). Motor neuron disease, TDP-43 pathology, and memory deficits in mice expressing ALS-FTD-linked UBQLN2 mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**: E7580–E7589.
- Lepore, AC, Haenggeli, C, Gasmi, M, Bishop, KM, Bartus, RT, Maragakis, NJ, *et al.* (2007). Intraparenchymal spinal cord delivery of adeno-associated virus IGF-1 is protective in the SOD1G93A model of ALS. *Brain Res.* **1185**: 256–265.
- Ling, S-C, Polymenidou, M and Cleveland, DW (2013). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* **79**: 416–438.
- Lin, MT and Beal, MF (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**: 787–795.
- Liu, X, Dobbie, M, Tunningley, R, Whittle, B, Zhang, Y, Ittner, LM, *et al.* (2011). ENU mutagenesis screen to establish motor phenotypes in wild-type mice and modifiers of a pre-existing motor phenotype in tau mutant mice. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**: 130947.
- Liu, Y, Pattamatta, A, Zu, T, Reid, T, Bardhi, O, Borchelt, DR, *et al.* (2016). C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron* **90**: 521–534.
- Liu, Z-J, Li, H-F, Tan, G-H, Tao, Q-Q, Ni, W, Cheng, X-W, *et al.* (2014). Identify mutation in amyotrophic lateral sclerosis cases using HaloPlex target enrichment system. *Neurobiol. Aging* **35**: 2881.e11-15.
- Li, Y, Ray, P, Rao, EJ, Shi, C, Guo, W, Chen, X, *et al.* (2010). A Drosophila model for TDP-43 proteinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 3169–3174.
- Loeb, JE, Cordier, WS, Harris, ME, Weitzman, MD and Hope, TJ (1999). Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **10**: 2295–2305.
- Lopez-Gonzalez, R, Lu, Y, Gendron, TF, Karydas, A, Tran, H, Yang, D, *et al.* (2016). Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron* **92**: 383–391.

- Lougheed, R and Turnbull, J (2011). Lack of effect of methylene blue in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* **6**: e23141.
- Ludolph, AC and Jesse, S (2009). Evidence-based drug treatment in amyotrophic lateral sclerosis and upcoming clinical trials. *Ther Adv Neurol Disord* **2**: 319–326.
- Mackenzie, IRA, Bigio, EH, Ince, PG, Geser, F, Neumann, M, Cairns, NJ, *et al.* (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann. Neurol.* **61**: 427–434.
- Mackenzie, IRA and Neumann, M (2016). Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies. *J. Neurochem.* **138 Suppl 1**: 54–70.
- MacLean, HE, Warne, GL and Zajac, JD (1996). Spinal and bulbar muscular atrophy: androgen receptor dysfunction caused by a trinucleotide repeat expansion. *J. Neurol. Sci.* **135**: 149–157.
- Majounie, E, Renton, AE, Mok, K, Dopper, EGP, Waite, A, Rollinson, S, *et al.* (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* **11**: 323–330.
- Maragakis, NJ (2010). Stem cells and the ALS neurologist. *Amyotroph Lateral Scler* **11**: 417–423.
- Marín, I (2014). The ubiquilin gene family: evolutionary patterns and functional insights. *BMC Evol. Biol.* **14**: 63.
- Maro, GS, Klassen, MP and Shen, K (2009). A beta-catenin-dependent Wnt pathway mediates anteroposterior axon guidance in *C. elegans* motor neurons. *PLoS ONE* **4**: e4690.
- Martinez-Vicente, M and Cuervo, AM (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* **6**: 352–361.
- Maruyama, H, Morino, H, Ito, H, Izumi, Y, Kato, H, Watanabe, Y, *et al.* (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **465**: 223–226.
- Massey, AC, Zhang, C and Cuervo, AM (2006). Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* **73**: 205–235.
- Mattis, VB and Svendsen, CN (2011). Induced pluripotent stem cells: a new revolution for clinical neurology? *Lancet Neurol* **10**: 383–394.
- Matyja, E, Taraszewska, A, Nagańska, E, Rafałowska, J and Gebarowska, J (2006). Astroglial alterations in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. *Folia Neuropathol* **44**: 183–190.
- Mazzini, L, Fagioli, F, Boccaletti, R, Mareschi, K, Oliveri, G, Olivieri, C, *et al.* (2003). Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **4**: 158–161.
- McCarty, DM, Fu, H, Monahan, PE, Toulson, CE, Naik, P and Samulski, RJ (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther.* **10**: 2112–2118.
- McCarty, DM, Monahan, PE and Samulski, RJ (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* **8**: 1248–1254.
- McCarty, DM (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol. Ther.* **16**: 1648–1656.
- McCombe, PA and Henderson, RD (2010). Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Genet Med* **7**: 557–570.

- McCown, TJ (2011). Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in the CNS. *Curr Gene Ther* **11**: 181–188.
- McGuire, V, Longstreth, WT, Koepsell, TD and van Belle, G (1996). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in three counties in western Washington state. *Neurology* **47**: 571–573.
- Meamar, R, Nasr-Esfahani, MH, Mousavi, SA and Basiri, K (2013). Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Neurosci* **20**: 1659–1663.
- Medina, DX, Caccamo, A and Oddo, S (2011). Methylene blue reduces a β levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity. *Brain Pathol.* **21**: 140–149.
- Menzies, FM, Cookson, MR, Taylor, RW, Turnbull, DM, Chrzanowska-Lightowlers, ZMA, Dong, L, *et al.* (2002). Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **125**: 1522–1533.
- Meyer, K, Ferraiuolo, L, Schmelzer, L, Braun, L, McGovern, V, Likhite, S, *et al.* (2015). Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: a dose-response study in mice and nonhuman primates. *Mol. Ther.* **23**: 477–487.
- Miclescu, A, Sharma, HS, Martijn, C and Wiklund, L (2010). Methylene blue protects the cortical blood-brain barrier against ischemia/reperfusion-induced disruptions. *Crit. Care Med.* **38**: 2199–2206.
- Miller, TM and Cleveland, DW (2003). Has gene therapy for ALS arrived? *Nat. Med.* **9**: 1256–1257.
- Miller, TM, Pestronk, A, David, W, Rothstein, J, Simpson, E, Appel, SH, *et al.* (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol* **12**: 435–442.
- Millet, R, Rossi, A, Ploquin, A, Epstein, A L, Greco A, Salvetti A (2013). Les vecteurs AAV pour le transfert de gène *in vivo* ou comment un petit virus devient grand. *Virologie* **17** : 343-353.
- Mitchell, JC, Constable, R, So, E, Vance, C, Scotter, E, Glover, L, *et al.* (2015). Wild type human TDP-43 potentiates ALS-linked mutant TDP-43 driven progressive motor and cortical neuron degeneration with pathological features of ALS. *Acta Neuropathol Commun* **3**: 36.
- Mitsumoto, H, Santella, RM, Liu, X, Bogdanov, M, Zipprich, J, Wu, H-C, *et al.* (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler* **9**: 177–183.
- Mizielinska, S, Grönke, S, Niccoli, T, Ridler, CE, Clayton, EL, Devoy, A, *et al.* (2014). C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in Drosophila through arginine-rich proteins. *Science* **345**: 1192–1194.
- Mizielinska, S, Lashley, T, Norona, FE, Clayton, EL, Ridler, CE, Fratta, P, *et al.* (2013). C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci. *Acta Neuropathol.* **126**: 845–857.
- Mizushima, N (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 2**: 1535–1541.
- Monani, UR (2005). Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* **48**: 885–896.
- Montuschi, A, Iazzolino, B, Calvo, A, Moglia, C, Lopiano, L, Restagno, G, *et al.* (2015). Cognitive correlates in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study in Italy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **86**: 168–173.
- Moreno-Igoa, M, Calvo, AC, Penas, C, Manzano, R, Oliván, S, Muñoz, MJ, *et al.* (2010). Fragment C of tetanus toxin, more than a carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *J. Mol. Med.* **88**: 297–308.
- Moreno-Igoa, M, Manzano, R, Oliván, S, Calvo, AC, Toivonen, JM and Osta, R (2010). Effects of gene therapy on muscle 18S rRNA expression in mouse model of ALS. *BMC Res Notes* **3**: 275.

- Mouisel, E, Blondet, B, Escourrou, P, Chatonnet, A, Molgó, J and Ferry, A (2006). Outcome of acetylcholinesterase deficiency for neuromuscular functioning. *Neurosci. Res.* **55**: 389–396.
- Musarò, A (2010). State of the art and the dark side of amyotrophic lateral sclerosis. *World J Biol Chem* **1**: 62–68.
- Nagoshi, N, Nakashima, H and Fehlings, MG (2015). Riluzole as a neuroprotective drug for spinal cord injury: from bench to bedside. *Molecules* **20**: 7775–7789.
- Narendra, D, Kane, LA, Hauser, DN, Fearnley, IM and Youle, RJ (2010). p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* **6**: 1090–1106.
- Narsapur, SL and Naylor, GJ (1983). Methylene blue. A possible treatment for manic depressive psychosis. *J Affect Disord* **5**: 155–161.
- Naylor, GJ, Dick, DA, Johnston, BB, Hopwood, SE, Dick, EG, Smith, AH, *et al.* (1981). Possible explanation for therapeutic action of lithium, and a possible substitute (methylene-blue). *Lancet* **2**: 1175–1176.
- N'Diaye, E-N, Kajihara, KK, Hsieh, I, Morisaki, H, Debnath, J and Brown, EJ (2009). PLIC proteins or ubiquilins regulate autophagy-dependent cell survival during nutrient starvation. *EMBO Rep.* **10**: 173–179.
- Neary, D, Snowden, JS, Gustafson, L, Passant, U, Stuss, D, Black, S, *et al.* (1998). Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* **51**: 1546–1554.
- Neumann, M, Sampathu, DM, Kwong, LK, Truax, AC, Micsenyi, MC, Chou, TT, *et al.* (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **314**: 130–133.
- Nishino, I (2003). Autophagic vacuolar myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* **3**: 64–69.
- Oldfield, V, Keating, GM and Perry, CM (2007). Rasagiline: a review of its use in the management of Parkinson's disease. *Drugs* **67**: 1725–1747.
- O'Leary, JL, Petty, J, Harris, AB and Inukai, J (1968). Supravital staining of mammalian brain with intra-arterial methylene blue followed by pressurized oxygen. *Stain Technol* **43**: 197–201.
- O'Rourke, JG, Bogdanik, L, Muhammad, AKMG, Gendron, TF, Kim, KJ, Austin, A, *et al.* (2015). C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD. *Neuron* **88**: 892–901.
- Osaka, M, Ito, D and Suzuki, N (2016). Disturbance of proteasomal and autophagic protein degradation pathways by amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in ubiquilin 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **472**: 324–331.
- Osawa, T, Mizuno, Y, Fujita, Y, Takatama, M, Nakazato, Y and Okamoto, K (2011). Optineurin in neurodegenerative diseases. *Neuropathology* **31**: 569–574.
- Paban, V, Manrique, C, Filali, M, Maunoir-Regimbal, S, Fauvelle, F and Alescio-Lautier, B (2014). Therapeutic and preventive effects of methylene blue on Alzheimer's disease pathology in a transgenic mouse model. *Neuropharmacology* **76 Pt A**: 68–79.
- Palmiter, RD, Sandgren, EP, Avarbock, MR, Allen, DD and Brinster, RL (1991). Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 478–482.
- Papadeas, ST and Maragakis, NJ (2009). Advances in stem cell research for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 545–551.
- Pasinelli, P, Houseweart, MK, Brown, RH and Cleveland, DW (2000). Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 13901–13906.

- Pasinelli, P, Belford, ME, Lennon, N, Bacskai, BJ, Hyman, BT, Trotti, D, *et al.* (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* **43**: 19–30.
- Pasinelli, P and Brown, RH (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**: 710–723.
- Passini, MA, Watson, DJ, Vite, CH, Landsburg, DJ, Feigenbaum, AL and Wolfe, JH (2003). Intraventricular brain injection of adeno-associated virus type 1 (AAV1) in neonatal mice results in complementary patterns of neuronal transduction to AAV2 and total long-term correction of storage lesions in the brains of beta-glucuronidase-deficient mice. *J. Virol.* **77**: 7034–7040.
- Pattee, GL, Post, GR, Gerber, RE and Bennett, JP (2003). Reduction of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis following pramipexole treatment. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **4**: 90–95.
- Paulus, JD and Link, BA (2014). Loss of optineurin in vivo results in elevated cell death and alters axonal trafficking dynamics. *PLoS ONE* **9**: e109922.
- Peters, OM, Cabrera, GT, Tran, H, Gendron, TF, McKeon, JE, Metterville, J, *et al.* (2015). Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Neuron* **88**: 902–909.
- Pfohl, SR, Halicek, MT and Mitchell, CS (2015). Characterization of the Contribution of Genetic Background and Gender to Disease Progression in the SOD1 G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. *J Neuromuscul Dis* **2**: 137–150.
- Phukan, J (2010). Arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *IDrugs* **13**: 482–496.
- Picher-Martel, V, Valdmanis, PN, Gould, PV, Julien, J-P and Dupré, N (2016). From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta Neuropathol Commun* **4**: 70.
- Pickart, CM (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 503–533.
- Pimenta de Castro, I, Costa, AC, Lam, D, Tufi, R, Fedele, V, Moiso, N, *et al.* (2012). Genetic analysis of mitochondrial protein misfolding in *Drosophila melanogaster*. *Cell Death Differ.* **19**: 1308–1316.
- Pradat, P-F and Bruneteau, G (2006). [Differential diagnosis and atypical subsets of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev. Neurol. (Paris)* **162 Spec No 2**: 4S81-84S90.
- Quarta, E, Bravi, R, Scambi, I, Mariotti, R and Minciacchi, D (2015). Increased anxiety-like behavior and selective learning impairments are concomitant to loss of hippocampal interneurons in the presymptomatic SOD1(G93A) ALS mouse model. *J. Comp. Neurol.* **523**: 1622–1638.
- Raaphorst, J, Beeldman, E, Schmand, B, Berkhout, J, Linssen, WHJP, van den Berg, LH, *et al.* (2012). The ALS-FTD-Q: a new screening tool for behavioral disturbances in ALS. *Neurology* **79**: 1377–1383.
- Ratnavalli, E, Brayne, C, Dawson, K and Hodges, JR (2002). The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* **58**: 1615–1621.
- Ratti, A and Buratti, E (2016). Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J. Neurochem.* **138 Suppl 1**: 95–111.
- Ray, SS and Lansbury, PT (2004). A possible therapeutic target for Lou Gehrig's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 5701–5702.
- Rea, SL, Majcher, V, Searle, MS and Layfield, R (2014). SQSTM1 mutations--bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD. *Exp. Cell Res.* **325**: 27–37.

Reaume, AG, Elliott, JL, Hoffman, EK, Kowall, NW, Ferrante, RJ, Siwek, DF, *et al.* (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* **13**: 43–47.

Régulier, E, Schneider, BL, Déglon, N, Beuzard, Y and Aebischer, P (1998). Continuous delivery of human and mouse erythropoietin in mice by genetically engineered polymer encapsulated myoblasts. *Gene Ther.* **5**: 1014–1022.

Renton, AE, Chiò, A and Traynor, BJ (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* **17**: 17–23.

Reyes, NA, Fisher, JK, Austgen, K, VandenBerg, S, Huang, EJ and Oakes, SA (2010). Blocking the mitochondrial apoptotic pathway preserves motor neuron viability and function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Clin. Invest.* **120**: 3673–3679.

Riha, PD, Rojas, JC and Gonzalez-Lima, F (2011). Beneficial network effects of methylene blue in an amnesic model. *Neuroimage* **54**: 2623–2634.

Ringholz, GM, Appel, SH, Bradshaw, M, Cooke, NA, Mosnik, DM and Schulz, PE (2005). Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* **65**: 586–590.

Robertson, J, Sanelli, T, Xiao, S, Yang, W, Horne, P, Hammond, R, *et al.* (2007). Lack of TDP-43 abnormalities in mutant SOD1 transgenic mice shows disparity with ALS. *Neurosci. Lett.* **420**: 128–132.

Rosen, DR (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **364**: 362.

Rosen, DR, Bowling, AC, Patterson, D, Usdin, TB, Sapp, P, Mezey, E, *et al.* (1994). A frequent ala 4 to val superoxide dismutase-1 mutation is associated with a rapidly progressive familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **3**: 981–987.

Rosen, DR, Siddique, T, Patterson, D, Figlewicz, DA, Sapp, P, Hentati, A, *et al.* (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**: 59–62.

Rothenberg, C, Srinivasan, D, Mah, L, Kaushik, S, Peterhoff, CM, Ugolino, J, *et al.* (2010). Ubiquilin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **19**: 3219–3232.

Rothstein, JD, Van Kammen, M, Levey, AI, Martin, LJ and Kuncl, RW (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **38**: 73–84.

Rothstein, JD, Patel, S, Regan, MR, Haenggeli, C, Huang, YH, Bergles, DE, *et al.* (2005). Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* **433**: 73–77.

Rowland, LP and Shneider, NA (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **344**: 1688–1700.

Rubino, E, Rainero, I, Chiò, A, Rogaeva, E, Galimberti, D, Fenoglio, P, *et al.* (2012). SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **79**: 1556–1562.

Rubinsztein, DC, DiFiglia, M, Heintz, N, Nixon, RA, Qin, Z-H, Ravikumar, B, *et al.* (2005). Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* **1**: 11–22.

Ruitenbergh, MJ, Eggers, R, Boer, GJ and Verhaagen, J (2002). Adeno-associated viral vectors as agents for gene delivery: application in disorders and trauma of the central nervous system. *Methods* **28**: 182–194.

Rutherford, NJ, Zhang, Y-J, Baker, M, Gass, JM, Finch, NA, Xu, Y-F, *et al.* (2008). Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet.* **4**: e1000193.

Saberi, S, Stauffer, JE, Schulte, DJ and Ravits, J (2015). Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol Clin* **33**: 855–876.

- Salinas, PC and Zou, Y (2008). Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**: 339–358.
- Salminen, A, Kaarniranta, K, Haapasalo, A, Hiltunen, M, Soininen, H and Alafuzoff, I (2012). Emerging role of p62/sequestosome-1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **96**: 87–95.
- Sareen, D, O'Rourke, JG, Meera, P, Muhammad, AKMG, Grant, S, Simpkinson, M, *et al.* (2013). Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. *Sci Transl Med* **5**: 208ra149.
- Schirmer, RH, Adler, H, Pickhardt, M and Mandelkow, E (2011). Lest we forget you--methylene blue... *Neurobiol. Aging* **32**: 2325.e7-16.
- Schultz, BR and Chamberlain, JS (2008). Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol. Ther.* **16**: 1189–1199.
- Scotter, EL, Chen, H-J and Shaw, CE (2015). TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics* **12**: 352–363.
- Seelaar, H, Klijnsma, KY, de Koning, I, van der Lugt, A, Chiu, WZ, Azmani, A, *et al.* (2010). Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *J. Neurol.* **257**: 747–753.
- Seibenhener, ML, Babu, JR, Geetha, T, Wong, HC, Krishna, NR and Wooten, MW (2004). Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 8055–8068.
- Seibenhener, ML, Du, Y, Diaz-Meco, M-T, Moscat, J, Wooten, MC and Wooten, MW (2013). A role for sequestosome 1/p62 in mitochondrial dynamics, import and genome integrity. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**: 452–459.
- Seibenhener, ML, Geetha, T and Wooten, MW (2007). Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett.* **581**: 175–179.
- Sellier, C, Campanari, M-L, Julie Corbier, C, Gaucherot, A, Kolb-Cheynel, I, Oulad-Abdelghani, M, *et al.* (2016). Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *EMBO J.* **35**: 1276–1297.
- Sephton, CF, Tang, AA, Kulkarni, A, West, J, Brooks, M, Stubblefield, JJ, *et al.* (2014). Activity-dependent FUS dysregulation disrupts synaptic homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: E4769-4778.
- Shan, X, Voadlo, D and Krieger, C (2009). Mislocalization of TDP-43 in the G93A mutant SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Neurosci. Lett.* **458**: 70–74.
- Shaw, PJ (2005). Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **76**: 1046–1057.
- Shaw, PJ, Ince, PG, Falkous, G and Mantle, D (1995). Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann. Neurol.* **38**: 691–695.
- Shefner, JM, Reaume, AG, Flood, DG, Scott, RW, Kowall, NW, Ferrante, RJ, *et al.* (1999). Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* **53**: 1239–1246.
- Shevchenko, A, Wilm, M, Vorm, O and Mann, M (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**: 850–858.
- Singer, MA, Statland, JM, Wolfe, GI and Barohn, RJ (2007). Primary lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **35**: 291–302.
- Smith, R (1999). Paget's disease of bone: past and present. *Bone* **24**: 1S–2S.

- Smith, RA, Miller, TM, Yamanaka, K, Monia, BP, Condon, TP, Hung, G, *et al.* (2006). Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* **116**: 2290–2296.
- Snowden, JS, Neary, D and Mann, DMA (2002). Frontotemporal dementia. *Br J Psychiatry* **180**: 140–143.
- Sofola, OA, Jin, P, Qin, Y, Duan, R, Liu, H, de Haro, M, *et al.* (2007). RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CCG premutation repeat-induced neurodegeneration in a Drosophila model of FXTAS. *Neuron* **55**: 565–571.
- Sonntag, F, Schmidt, K and Kleinschmidt, JA (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 10220–10225.
- Sontag, EM, Lotz, GP, Agrawal, N, Tran, A, Aron, R, Yang, G, *et al.* (2012). Methylene blue modulates huntingtin aggregation intermediates and is protective in Huntington's disease models. *J. Neurosci.* **32**: 11109–11119.
- Sreedharan, J, Blair, IP, Tripathi, VB, Hu, X, Vance, C, Rogelj, B, *et al.* (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **319**: 1668–1672.
- Sta, M, Sylva-Steenland, RMR, Casula, M, de Jong, JMBV, Troost, D, Aronica, E, *et al.* (2011). Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: evidence of complement activation. *Neurobiol. Dis.* **42**: 211–220.
- Stoica, L, Todeasa, SH, Cabrera, GT, Salameh, JS, ElMallah, MK, Mueller, C, *et al.* (2016). Adeno-associated virus-delivered artificial microRNA extends survival and delays paralysis in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Ann. Neurol.* **79**: 687–700.
- Stoica, R, De Vos, KJ, Paillusson, S, Mueller, S, Sancho, RM, Lau, K-F, *et al.* (2014). ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat Commun* **5**: 3996.
- Stoica, R, Paillusson, S, Gomez-Suaga, P, Mitchell, JC, Lau, DH, Gray, EH, *et al.* (2016). ALS/FTD-associated FUS activates GSK-3 β to disrupt the VAPB-PTIP51 interaction and ER-mitochondria associations. *EMBO Rep.* **17**: 1326–1342.
- Storek, B, Harder, NM, Banck, MS, Wang, C, McCarty, DM, Janssen, WG, *et al.* (2006). Intrathecal long-term gene expression by self-complementary adeno-associated virus type 1 suitable for chronic pain studies in rats. *Mol Pain* **2**: 4.
- Storkebaum, E, Lambrechts, D, Dewerchin, M, Moreno-Murciano, M-P, Appelmans, S, Oh, H, *et al.* (2005). Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat. Neurosci.* **8**: 85–92.
- Strong, MJ (2003). The basic aspects of therapeutics in amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacol. Ther.* **98**: 379–414.
- Strong, MJ, Grace, GM, Freedman, M, Lomen-Hoerth, C, Woolley, S, Goldstein, LH, *et al.* (2009). Consensus criteria for the diagnosis of frontotemporal cognitive and behavioural syndromes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* **10**: 131–146.
- Sullivan, PM, Zhou, X, Robins, AM, Paushter, DH, Kim, D, Smolka, MB, *et al.* (2016). The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. *Acta Neuropathol Commun* **4**: 51.
- Swarup, V, Phaneuf, D, Bareil, C, Robertson, J, Rouleau, GA, Kriz, J, *et al.* (2011). Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain* **134**: 2610–2626.
- Swarup, V, Phaneuf, D, Dupré, N, Petri, S, Strong, M, Kriz, J, *et al.* (2011). Deregulation of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis triggers nuclear factor κ B-mediated pathogenic pathways. *J. Exp. Med.* **208**: 2429–2447.

Synofzik, M, Maetzler, W, Grehl, T, Prudlo, J, Vom Hagen, JM, Haack, T, *et al.* (2012). Screening in ALS and FTD patients reveals 3 novel UBQLN2 mutations outside the PXX domain and a pure FTD phenotype. *Neurobiol. Aging* **33**: 2949.e13-17.

Tanaka, K and Matsuda, N (2014). Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**: 197–204.

Tanguy, Y, Biferi, MG, Besse, A, Astord, S, Cohen-Tannoudji, M, Marais, T, *et al.* (2015). Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice. *Front Mol Neurosci* **8**: 36.

Taylor, JP, Brown, RH and Cleveland, DW (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* **539**: 197–206.

Tenenbaum, L, Chtarto, A, Lehtonen, E, Velu, T, Brotchi, J and Levivier, M (2004). Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S212-222.

Therrien, M, Rouleau, GA, Dion, PA and Parker, JA (2013). Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in *C. elegans*. *PLoS ONE* **8**: e83450.

Thomsen, GM, Gowing, G, Svendsen, S and Svendsen, CN (2014). The past, present and future of stem cell clinical trials for ALS. *Exp. Neurol.* **262 Pt B**: 127–137.

Timpe, J, Bevington, J, Casper, J, Dignam, JD and Trempe, JP (2005). Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Curr Gene Ther* **5**: 273–284.

Tran, H, Almeida, S, Moore, J, Gendron, TF, Chalasani, U, Lu, Y, *et al.* (2015). Differential Toxicity of Nuclear RNA Foci versus Dipeptide Repeat Proteins in a *Drosophila* Model of C9ORF72 FTD/ALS. *Neuron* **87**: 1207–1214.

Troost, D, Van den Oord, JJ and Vianney de Jong, JM (1990). Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **16**: 401–410.

Trushina, E, Du Charme, J, Parisi, J and McMurray, CT (2006). Neurological abnormalities in caveolin-1 knock out mice. *Behav. Brain Res.* **172**: 24–32.

Tsai, RM and Boxer, AL (2016). Therapy and clinical trials in frontotemporal dementia: past, present, and future. *J. Neurochem.* **138 Suppl 1**: 211–221.

Turner, BJ and Talbot, K (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog. Neurobiol.* **85**: 94–134.

Urwin, H, Josephs, KA, Rohrer, JD, Mackenzie, IR, Neumann, M, Authier, A, *et al.* (2010). FUS pathology defines the majority of tau- and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol.* **120**: 33–41.

Vaccaro, A, Patten, SA, Aggad, D, Julien, C, Maios, C, Kabashi, E, *et al.* (2013). Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity in vivo. *Neurobiol. Dis.* **55**: 64–75.

Vaccaro, A, Patten, SA, Ciura, S, Maios, C, Therrien, M, Drapeau, P, *et al.* (2012). Methylene blue protects against TDP-43 and FUS neuronal toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*. *PLoS ONE* **7**: e42117.

Vance, C, Rogelj, B, Hortobágyi, T, De Vos, KJ, Nishimura, AL, Sreedharan, J, *et al.* (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* **323**: 1208–1211.

Van Langenhove, T, van der Zee, J and Van Broeckhoven, C (2012). The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Ann. Med.* **44**: 817–828.

Vargas, MR and Johnson, JA (2010). Astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics* **7**: 471–481.

- Vengoechea, J, David, MP, Yaghi, SR, Carpenter, L and Rudnicki, SA (2013). Clinical variability and female penetrance in X-linked familial FTD/ALS caused by a P506S mutation in UBQLN2. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **14**: 615–619.
- Vinsant, S, Mansfield, C, Jimenez-Moreno, R, Del Gaizo Moore, V, Yoshikawa, M, Hampton, TG, *et al.* (2013). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav* **3**: 335–350.
- Votin, V, Nelson, WJ and Barth, AIM (2005). Neurite outgrowth involves adenomatous polyposis coli protein and beta-catenin. *J. Cell. Sci.* **118**: 5699–5708.
- Waibel, S, Neumann, M, Rosenbohm, A, Birve, A, Volk, AE, Weishaupt, JH, *et al.* (2013). Truncating mutations in FUS/TLS give rise to a more aggressive ALS-phenotype than missense mutations: a clinico-genetic study in Germany. *Eur. J. Neurol.* **20**: 540–546.
- Waibel, S, Reuter, A, Malessa, S, Blaugrund, E and Ludolph, AC (2004). Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. *J. Neurol.* **251**: 1080–1084.
- Waite, AJ, Bäumer, D, East, S, Neal, J, Morris, HR, Ansorge, O, *et al.* (2014). Reduced C9orf72 protein levels in frontal cortex of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration brain with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion. *Neurobiol. Aging* **35**: 1779.e5-1779.e13.
- Walters, KJ, Kleijnen, MF, Goh, AM, Wagner, G and Howley, PM (2002). Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a. *Biochemistry* **41**: 1767–1777.
- Wang, H, Yang, B, Qiu, L, Yang, C, Kramer, J, Su, Q, *et al.* (2014). Widespread spinal cord transduction by intrathecal injection of rAAV delivers efficacious RNAi therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **23**: 668–681.
- Wang, L, Popko, B, Tixier, E and Roos, RP (2014). Guanabenz, which enhances the unfolded protein response, ameliorates mutant SOD1-induced amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **71**: 317–324.
- Wang, W, Li, L, Lin, W-L, Dickson, DW, Petrucelli, L, Zhang, T, *et al.* (2013). The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum. Mol. Genet.* **22**: 4706–4719.
- Ward, AJ, Norrbom, M, Chun, S, Bennett, CF and Rigo, F (2014). Nonsense-mediated decay as a terminating mechanism for antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **42**: 5871–5879.
- Watanabe, M, Dykes-Hoberg, M, Culotta, VC, Price, DL, Wong, PC and Rothstein, JD (2001). Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol. Dis.* **8**: 933–941.
- Wen, Y, Li, W, Poteet, EC, Xie, L, Tan, C, Yan, L-J, *et al.* (2011). Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection. *J. Biol. Chem.* **286**: 16504–16515.
- Wiedemann, FR, Manfredi, G, Mawrin, C, Beal, MF and Schon, EA (2002). Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J. Neurochem.* **80**: 616–625.
- Wiedemann, FR, Winkler, K, Kuznetsov, AV, Bartels, C, Vielhaber, S, Feistner, H, *et al.* (1998). Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **156**: 65–72.
- Wiklund, L, Basu, S, Miclescu, A, Wiklund, P, Ronquist, G and Sharma, HS (2007). Neuro- and cardioprotective effects of blockade of nitric oxide action by administration of methylene blue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1122**: 231–244.
- Williams, KL, Warraich, ST, Yang, S, Solski, JA, Fernando, R, Rouleau, GA, *et al.* (2012). UBQLN2/ubiquilin 2 mutation and pathology in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* **33**: 2527.e3-10.

- Wils, H, Kleinberger, G, Janssens, J, Pereson, S, Joris, G, Cuijt, I, *et al.* (2010). TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 3858–3863.
- Wischnik, CM, Staff, RT, Wischnik, DJ, Bentham, P, Murray, AD, Storey, JMD, *et al.* (2015). Tau aggregation inhibitor therapy: an exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **44**: 705–720.
- Wischnik, CM, Edwards, PC, Lai, RY, Roth, M and Harrington, CR (1996). Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 11213–11218.
- Wu, AL, Wang, J, Zheleznyak, A and Brown, EJ (1999). Ubiquitin-related proteins regulate interaction of vimentin intermediate filaments with the plasma membrane. *Mol. Cell* **4**: 619–625.
- Wu, H, Lu, Y, Barik, A, Joseph, A, Taketo, MM, Xiong, W-C, *et al.* (2012). β -Catenin gain of function in muscles impairs neuromuscular junction formation. *Development* **139**: 2392–2404.
- Wu, L-S, Cheng, W-C and Shen, C-KJ (2012). Targeted depletion of TDP-43 expression in the spinal cord motor neurons leads to the development of amyotrophic lateral sclerosis-like phenotypes in mice. *J. Biol. Chem.* **287**: 27335–27344.
- Wu, Q, Liu, M, Huang, C, Liu, X, Huang, B, Li, N, *et al.* (2015). Pathogenic Ubqln2 gains toxic properties to induce neuron death. *Acta Neuropathol.* **129**: 417–428.
- Xiao, S, MacNair, L, McGoldrick, P, McKeever, PM, McLean, JR, Zhang, M, *et al.* (2015). Isoform-specific antibodies reveal distinct subcellular localizations of C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **78**: 568–583.
- Xia, Y, Yan, LH, Huang, B, Liu, M, Liu, X and Huang, C (2014). Pathogenic mutation of UBQLN2 impairs its interaction with UBXD8 and disrupts endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *J. Neurochem.* **129**: 99–106.
- Xu, K, Zhong, G and Zhuang, X (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* **339**: 452–456.
- Xu, Y-F, Gendron, TF, Zhang, Y-J, Lin, W-L, D'Alton, S, Sheng, H, *et al.* (2010). Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J. Neurosci.* **30**: 10851–10859.
- Yamashita, M, Nonaka, T, Arai, T, Kametani, F, Buchman, VL, Ninkina, N, *et al.* (2009). Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Lett.* **583**: 2419–2424.
- Yang, M, Liang, C, Swaminathan, K, Herrlinger, S, Lai, F, Shiekhatar, R, *et al.* (2016). A C9ORF72/SMCR8-containing complex regulates ULK1 and plays a dual role in autophagy. *Sci Adv* **2**: e1601167.
- Yong, VW and Rivest, S (2009). Taking advantage of the systemic immune system to cure brain diseases. *Neuron* **64**: 55–60.
- Zabel, C, Nguyen, HP, Hin, SC, Hartl, D, Mao, L and Klose, J (2010). Proteasome and oxidative phosphorylation changes may explain why aging is a risk factor for neurodegenerative disorders. *J. Proteomics* **73**: 2230–2238.
- Zacharoff, L, Tkac, I, Song, Q, Tang, C, Bolan, PJ, Mangia, S, *et al.* (2012). Cortical metabolites as biomarkers in the R6/2 model of Huntington's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**: 502–514.
- Zarrinpar, A, Bhattacharyya, RP and Lim, WA (2003). The structure and function of proline recognition domains. *Sci. STKE* **2003**: RE8.
- Zhang, C and Saunders, AJ (2009). An emerging role for Ubiquilin 1 in regulating protein quality control system and in disease pathogenesis. *Discov Med* **8**: 18–22.

- Zhang, KY, Yang, S, Warraich, ST and Blair, IP (2014). Ubiquilin 2: a component of the ubiquitin-proteasome system with an emerging role in neurodegeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **50**: 123–126.
- Zhang, Y-J, Xu, Y-F, Cook, C, Gendron, TF, Roettges, P, Link, CD, *et al.* (2009). Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 7607–7612.
- Zhang, Y-J, Xu, Y, Dickey, CA, Buratti, E, Baralle, F, Bailey, R, *et al.* (2007). Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J. Neurosci.* **27**: 10530–10534.
- Zhao, P, Ignacio, S, Beattie, EC and Abood, ME (2008). Altered presymptomatic AMPA and cannabinoid receptor trafficking in motor neurons of ALS model mice: implications for excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* **27**: 572–579.
- Zhao, W, Beers, DR and Appel, SH (2013). Immune-mediated mechanisms in the pathoprosession of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* **8**: 888–899.
- Zheng, C, Sköld, MK, Li, J, Nennesmo, I, Fadeel, B and Henter, J-I (2007). VEGF reduces astrogliosis and preserves neuromuscular junctions in ALS transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**: 989–993.
- Zinman, L and Cudkovicz, M (2011). Emerging targets and treatments in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* **10**: 481–490.
- Zou, Z-Y, Zhou, Z-R, Che, C-H, Liu, C-Y, He, R-L and Huang, H-P (2017). Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* doi:10.1136/jnnp-2016-315018.
- Zu, T, Liu, Y, Bañez-Coronel, M, Reid, T, Pletnikova, O, Lewis, J, *et al.* (2013). RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**: E4968-4977.

Livres scientifiques:

Cruveilhier, J (1853–4). Sur la paralysie musculaire, progressive, atrophique. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine (Paris): p. 19; 286; 490–501; 546–83.

Bromberg, M (2015). Motor neuron disease in adults. Edited by Bromberg, M. Oxford University Press: p. 3 et 4.

Bowles D, Rabinowitz, J E, Samulski, R J (2006). The genus Dependoviruses. In Parvoviruses. Edited by Kerr J R, Cotmore S F, editors. London, UK: Hodder Arnold : p. 15–24.

Berns, K, and Parrish, C R (2007). Parvoviridae. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), Fields virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. : p. 2437-2478.

Muzyczka, N, and Berns, K I (2001). Parvoviridae: the viruses and their replication. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffen, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), Fields virology, vol. 2. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa : p. 2327-2359.

Berns, K I (1996). *Parvoviridae*: the viruses and their replication. In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M, et al., editors. Field's virology. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers: p. 2173–2198.

Site internet :

« ALSod database » : <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>

ANNEXE

A New AAV10-U7-Mediated Gene Therapy Prolongs Survival and Restores Function in an ALS Mouse Model

Maria Grazia Biferi,¹ Mathilde Cohen-Tannoudji,¹ Ambra Cappelletto,¹ Benoit Giroux,¹ Marianne Roda,¹ Stéphanie Astord,¹ Thibaut Marais,¹ Corinne Bos,¹ Thomas Voit,³ Arnaud Ferry,^{1,2} and Martine Barkats¹

¹Centre of Research in Myology (CRM), Institut de Myologie, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Inserm UMRS974, GH Pitié Salpêtrière, Paris 75013, France;

²Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Paris 75006, France; ³NIHR GOSH Biomedical Research Centre, Great Ormond Street Institute of Child Health, University College London, and Great Ormond Street Hospital Trust, London WC1N 1EH, UK

One of the most promising therapeutic approaches for familial amyotrophic lateral sclerosis linked to superoxide dismutase 1 (SOD1) is the suppression of toxic mutant SOD1 in the affected tissues. Here, we report an innovative molecular strategy for inducing substantial, widespread, and sustained reduction of mutant human SOD1 (hSOD1) levels throughout the body of SOD1^{G93A} mice, leading to therapeutic effects in animals. Adeno-associated virus serotype rh10 vectors (AAV10) were used to mediate exon skipping of the hSOD1 pre-mRNA by expression of exon-2-targeted antisense sequences embedded in a modified U7 small-nuclear RNA (AAV10-U7-hSOD). Skipping of hSOD1 exon 2 led to the generation of a premature termination codon, inducing production of a deleted transcript that was subsequently degraded by the activation of nonsense-mediated decay. Combined intravenous and intracerebroventricular delivery of AAV10-U7-hSOD increased the survival of SOD1^{G93A} mice injected either at birth or at 50 days of age (by 92% and 58%, respectively) and prevented weight loss and the decline of neuromuscular function. This study reports the effectiveness of an exon-skipping approach in SOD1-ALS mice, supporting the translation of this technology to the treatment of this as yet incurable disease.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset motor neuron (MN) disorder, characterized by MN degeneration, severe paralysis, and death within 3–5 years after diagnosis.¹ No treatment is currently available, except the drug Riluzole, which offers only a modest survival benefit.² ALS is epidemiologically classified into sporadic (90%–95%) and familial (5%–10%) forms (fALS);³ approximately 12% of fALS cases are caused by over 180 mutations in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene, conferring a toxic gain of function to the mutant protein.^{4,5}

Continuous infusion of antisense oligonucleotides (ASOs) into the brain ventricles has been reported as a promising approach to induce significant SOD1 silencing in SOD1^{G93A} rats, but only 10 days of survival extension was achieved with infusion prior to disease onset.⁶ A phase I clinical study using intrathecally delivered ASOs to patients

revealed the absence of serious adverse effects, highlighting the feasibility of this strategy in humans.⁷ Significant SOD1 reduction has also been provided by injection of lentiviral vectors encoding short hairpin RNA targeting human SOD1 (SOD1-shRNA) into the spinal cord parenchyma or multiple muscle groups of SOD1^{G93A} mice.^{8,9} These approaches resulted in a substantial increase in ALS mouse survival, but their clinical applicability remains questionable, due notably to the difficult translation of the vector administration routes to patients.

More recently, the self-complementary adeno-associated virus (AAV) serotype 9 vector was used to deliver SOD1-shRNA in ALS mice after a single intravascular injection.¹⁰ This systemic AAV9 approach was successful in extending the lifespan of SOD1^{G93A} mice injected at birth or later.¹⁰ Another study using AAV serotype rh10 to express artificial microRNA (miRNA) also showed slowing of disease progression and extended survival in SOD1^{G93A} mice intrathecally injected with the vector at 65 days of age.¹¹ These and other^{12,13} recent AAV studies have provided encouraging therapeutic results and the potential of feasible translation to the clinic. However, these approaches have only led to incomplete rescue and better SOD1-silencing approaches in mice are still needed to provide promising treatment options to patients.

Transcriptional SOD1 silencing can be achieved by skipping of a constitutive SOD1 exon (exon skipping) using ASOs complementary to splicing regulatory elements on the primary transcript. The resulting deleted mRNA, containing a premature termination codon, is then degraded by the endogenous cellular surveillance nonsense-mediated decay pathway.^{14,15}

Here, we report the high therapeutic potential of this exon-skipping strategy in both newborn (P1) and adult (P50) SOD1^{G93A} mice using

Received 15 December 2016; accepted 25 May 2017;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.05.017>.

Correspondence: Maria Grazia Biferi, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Inserm UMRS974, Centre of Research in Myology (CRM), Institut de Myologie, GH Pitié Salpêtrière, Paris 75013, France.

E-mail: mg.biferi@institut-myologie.org

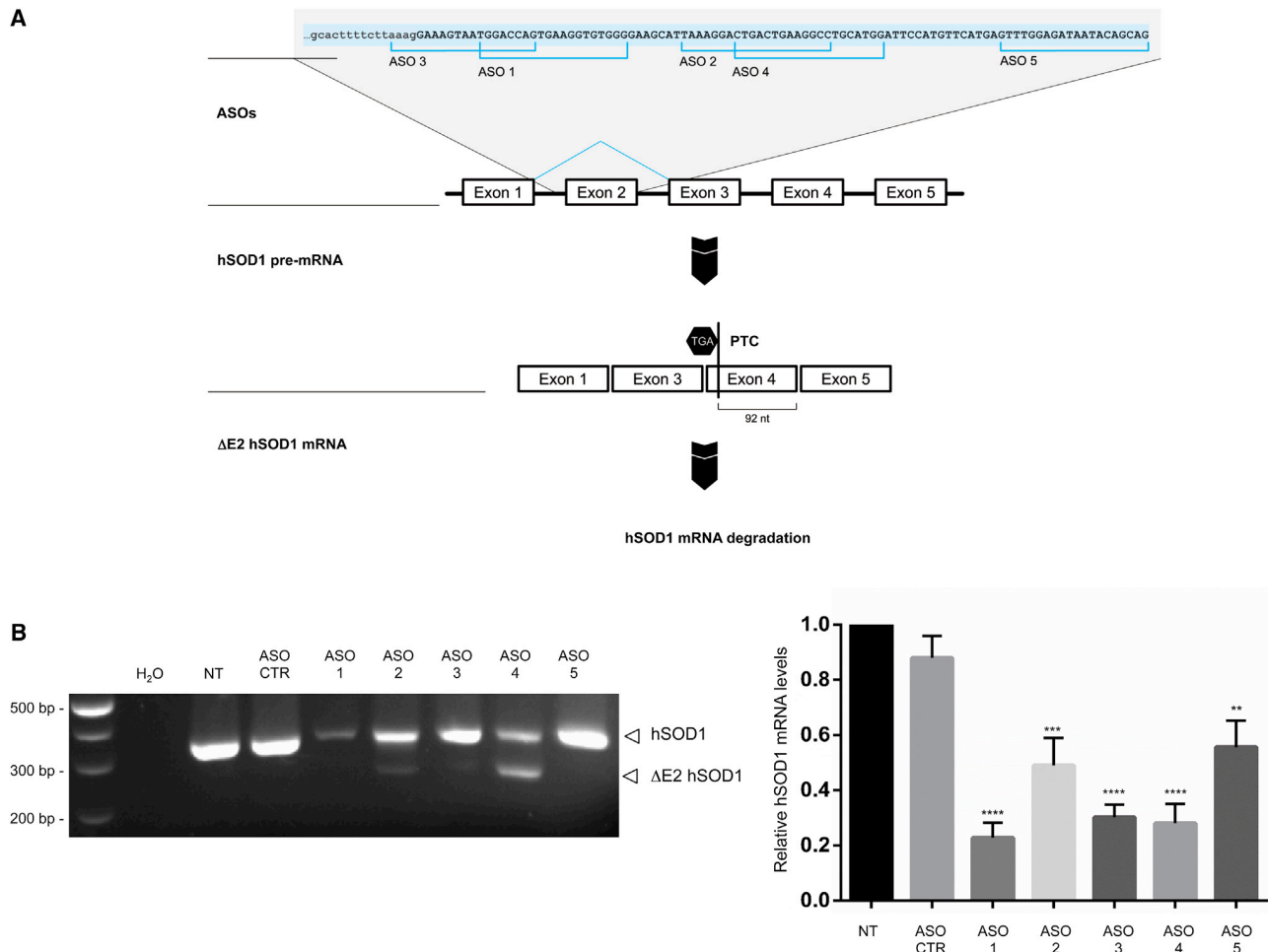


Figure 1. hSOD1 Exon Skipping Reduces mRNA Levels In Vitro

(A) Schematic representation of E2 skipping in the hSOD1 pre-mRNA induced by specific antisense oligonucleotides (hSOD1-ASO1 to 5). The 9,310-bp hSOD1 gene (Gene ID 6647) comprises five exons separated by four introns, encoding a 153-aa protein. E2 skipping leads to the formation of a premature termination codon (PTC) in exon 4 of the hSOD1-skipped mRNA (Δ E2 hSOD1), 92 nt upstream of the last exon/exon junction (exon 4-exon 5), inducing its degradation by nonsense-mediated decay (NMD) activation. (B) Semiquantitative RT-PCR analysis of HEK293T cells transfected with the five hSOD1-ASOs, showing Δ E2 hSOD1 mRNA production. H₂O, non-transfected cells (NT), and a scrambled control (ASO-CTR) were used as negative controls. Arrowheads indicate full-length (355 bp) and Δ E2 (258 bp) hSOD1 mRNA forms (the shown gel is one replicate of the experiment shown in Figure S1B). The bar graph on the right represents results of qRT-PCR analysis of full-length hSOD1 mRNA expression levels from another set of ASO-transfected HEK293T cells. hSOD1 mRNA was amplified using a specific probe mapping within exon 1-2 of the human SOD1 gene. Results correspond to the percent reduction of full-length hSOD1 mRNA induced by the different ASOs relative to NT. Data are expressed as the mean \pm SEM of four independent transfection experiments. Differences between groups were analyzed by one-way ANOVA analysis, followed by Tukey's post hoc test (**p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001).

the administration of ASOs against mutant human SOD1 (hSOD1) inserted in an AAV10-U7 vector (AAV10-U7-hSOD1). The AAV vector was co-injected into the central nervous system and the peripheral organs, combining intravenous (i.v.) and intracerebroventricular (i.c.v.) injections. This gene therapy approach induced efficient hSOD1 exon skipping in the spinal cord, resulting in a large reduction of hSOD1 mRNA and protein levels. SOD1^{G93A} mice survival was prolonged, with a mean increase in life expectancy of 92% and 58% for mice injected either at birth or 50 days of age, respectively. Disease onset was also delayed by 95 and 63 days, respectively, relative to un-

treated mice. Finally, AAV10-U7-hSOD1 delivery prevented weight loss and preserved motor function and skeletal muscle force.

RESULTS

Specific Antisense Sequences Promote hSOD1 Exon Skipping In Vitro

We rationally designed five steric, blocking RNA-based ASOs that masked the splicing acceptor site (SA) in intron 1 or exonic splicing enhancer sequences (ESEs)¹⁶ in exon 2 (E2) to promote efficient E2 skipping (Figures 1A and S1A). Skipping of hSOD1 E2 generates a

frameshift in the mRNA transcript, with production of a premature stop codon in exon 4 (E4), 92 nt upstream of the E4-E5 junction (Figure 1A). The deleted transcript ($\Delta E2$ hSOD1) is a likely substrate for the endogenous cellular surveillance nonsense-mediated decay pathway and is subsequently degraded because the premature stop codon is located greater than 55 nt upstream of the last exon-exon junction.¹⁷

The ASOs were chemically modified (2'-O-methyl phosphorothioate [2'OMePS]) to increase their stability, resist nuclease and RNase H degradation,¹⁸ and their ability to promote E2 skipping was evaluated (hSOD1-ASO). A scrambled fluorescently (FAM)-labeled ASO was used as control (ASO-CTR). After ASO transfection into HEK293T cells, RT-PCR analysis revealed a 258-nt band corresponding to the $\Delta E2$ hSOD1 mRNA variant in the samples transfected with hSOD1-ASO and a 355-nt product corresponding to the complete hSOD1 mRNA in all samples (Figures S1B and S1C). Although all ASOs resulted in a substantial reduction of hSOD1 mRNA levels relative to non-transfected cells, ASO1 and ASO4 showed the highest efficiency (Figure 1B). These two ASOs, targeting different ESE regions in E2, were both used in the following studies to expand the masked sequence and maximize steric hindrance to splicing factors.

AAV10-U7-Mediated Delivery of Antisense Sequences in SOD1^{G93A} Mice Reduces hSOD1 Protein and mRNA Levels

We sub-cloned the two AS sequences corresponding to ASO1 and ASO4 into the optimized U7-sRNA cassette (U7-AS-1/AS-4), previously described by Schumperli et al.¹⁹, to protect them from degradation. The embedding of ASOs into the U7snRNP particle has been reported to improve their nuclear entry and incorporation into the spliceosome and increase their stability in vivo.^{19,20} We then engineered the U7-AS-1/AS-4 cassette or a control AS, previously tested in vivo,²¹ into the AAV backbone, and the corresponding AAV10 vectors were produced (AAV10-U7-hSOD1 or AAV10-U7-CTR) (Figure 2A).

We locally injected the AAV10-U7-hSOD1 or the AAV10-U7-CTR vectors (4.7×10^{12} viral genome [vg]/kg, two sites, 4.8×10^{10} per site in 5 μ L) into the lumbar spinal cord of 50-day-old SOD1^{G93A} mice to analyze the efficiency of AAV10-U7-hSOD1 in reducing hSOD1 mRNA and protein levels in vivo. As expected, we found the $\Delta E2$ hSOD1 mRNA variant in the spinal cords of AAV10-U7-hSOD1-injected animals 1 month after injection, with a more than 80% reduction of full-length hSOD1 mRNA for each injected mouse (Figure 2B) and a 70% average reduction in hSOD1 protein relative to AAV10-U7-CTR-injected animals (Figure 2C). Due to the high degree of homology between hSOD1 and murine SOD1 sequences, ASOs were designed to be human specific, with AS-1/AS-4 presenting a total of ten mismatches to the mouse SOD1 mRNA (Figure S2A). Accordingly, the endogenous SOD1 protein levels were unchanged in all injected animals, confirming the specificity of AAV10-U7-hSOD1 for the hSOD1 form (Figures S2B and S2C).

Co-i.v./i.c.v. Administration of AAV10-U7-hSOD1 in Newborn SOD1^{G93A} Mice Prolongs Survival and Delays Disease Onset

To test the therapeutic efficacy of hSOD1 exon skipping, we injected SOD1^{G93A} mice on postnatal day 1 (PND1) with 4.5×10^{14} vg/kg of AAV10-U7-hSOD1 (n = 15) or AAV10-U7-CTR vectors (n = 17) co-injected into the temporal vein (i.v., 4×10^{14} vg/kg) and lateral ventricles (i.c.v., 5×10^{13} vg/kg) (co-i.v./i.c.v.) (Figure 3A). All AAV10-U7-hSOD1-injected SOD1^{G93A} mice survived substantially longer than did non-injected (NI) (n = 12) or AAV10-U7-CTR-injected mice (239 days versus 118 days or 125 days, respectively; $p < 0.0001$), for an extension of the median lifespan of 121 and 114 days, respectively. No statistically significant difference was found between the lifespans of AAV10-U7-CTR-injected and NI mice (Figure 3B).

The mean lifespan of AAV10-U7-hSOD1-injected mice was 95% and 92% longer than that of NI or AAV10-U7-CTR-injected mice, respectively (Figure 3C).

AAV10-U7-hSOD1 delivery also slowed the weight loss observed in NI SOD1^{G93A} mice at the end stage (23.9 ± 1.1 g versus 20.5 ± 0.9 g at 17 weeks, $p < 0.05$) (Figure 3D), and, importantly, AAV10-U7-hSOD1-injected mice gained weight until ~25 weeks of age, at which point weight reached a plateau. The weights of AAV10-treated SOD1^{G93A} mice and wild-type (WT) mice were statistically significantly different at 25 weeks of age (25.6 ± 1.4 g versus 30.7 ± 1.4 g, respectively; $p < 0.05$) (Figure 3D).

AAV10-U7-hSOD1 delivery significantly delayed disease onset, based on the age of peak body weight, by ~102 and 95 days relative to NI and AAV10-U7-CTR-injected mice, respectively (199.5 days versus 97.5 days and 104.5 days; $p < 0.0001$) (Figure 3E). No statistically significant difference was observed between disease onset of AAV10-U7-CTR-injected and NI mice (Figure 3E). The mean disease progression, defined as the time from disease onset to death, was significantly delayed by 14 days in AAV10-U7-hSOD1-injected mice (36.6 ± 4.9 days) relative to NI mice (23.1 ± 1.7 days, $p < 0.05$) and AAV10-U7-CTR-injected mice (22.8 ± 3.7 days, $p < 0.05$) (Figure 3F).

Co-i.v./i.c.v. Administration of AAV10-U7-hSOD1 in Newborn SOD1^{G93A} Mice Reduces hSOD1 Levels and Preserves Pathological Signs

We analyzed the efficacy of E2 skipping for the silencing of hSOD1 in the spinal cords of SOD1^{G93A} mice, co-i.v./i.c.v. injected at birth, both at 112 days of age (n = 3) and at the end stage (n = 3) (Figure S3). We observed a significant reduction of full-length hSOD1 mRNA at both ages relative to those of NI mice (76% and 65% reduction at 112 days of age and end stage, respectively; $p < 0.0001$) and AAV10-U7-CTR-injected mice (77% and 66% reduction at 112 days of age and end stage, respectively; $p < 0.0001$) (Figure S3A). The levels of hSOD1 protein were also reduced by 71% and 66% in the spinal cord of AAV10-U7-hSOD1-injected SOD1^{G93A} mice at 112 days of age relative to those of NI mice and AAV10-U7-CTR-injected mice,

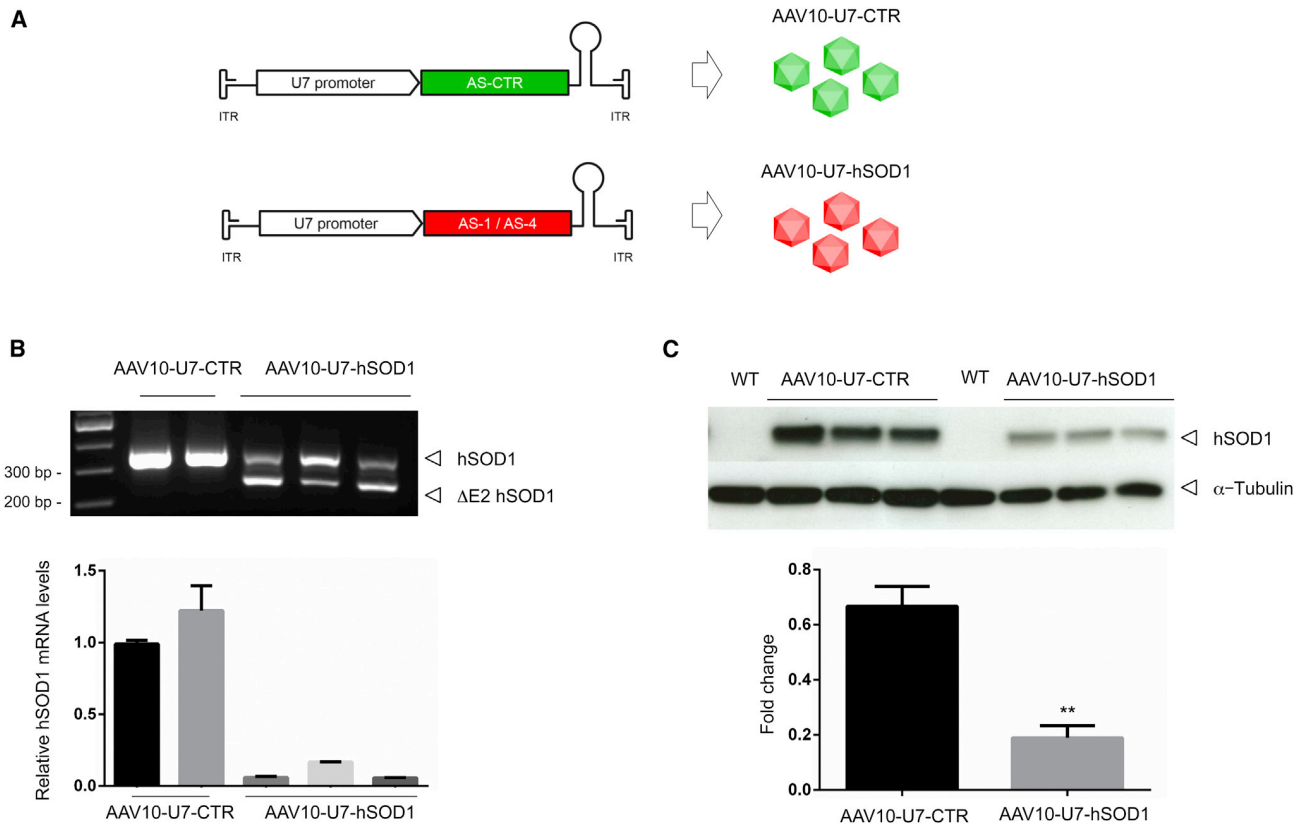


Figure 2. AAV-U7-Mediated hSOD1 Exon Skipping Reduces mRNA and Protein Levels In Vivo

(A) Design of the AAV vectors used to target hSOD1 (AAV10-U7-hSOD1) or control (AAV10-U7-CTR) sequences. The antisense sequences (ASs) corresponding to ASO1 and ASO4 were embedded into the optimized human U7 small nuclear RNA (snRNA)^{19,20} and cloned between two AAV inverted terminal repeats (ITRs). (B) The upper panel corresponds to a semiquantitative RT-PCR analysis of mRNA extracted from the spinal cord (SC) of SOD1^{G93A} mice, in which the lumbar SC was injected with 4.7×10^{12} vg/kg of AAV10-U7-hSOD1 (n = 3) or AAV10-U7-CTR (n = 2). The lower panel shows results of the corresponding qRT-PCR analysis, showing lower levels of full-length hSOD1 mRNA in SC from AAV10-U7-hSOD1-injected mice than AAV10-U7-CTR-injected controls. Data are expressed as the mean \pm SEM. (C) Western blot (WB) analysis of hSOD1 protein expression in SOD1^{G93A} mice, in which the SC was injected with AAV10-U7-hSOD1 (n = 3) or AAV10-U7-CTR (n = 3) (4.7×10^{12} vg/kg). Antibody specificity for the human form of SOD1 was demonstrated by the absence of signal in protein extracts from WT mice. α -Tubulin was used as a loading control. The lower panel corresponds to the densitometric analysis of WB results, showing the significant reduction of hSOD1 levels in the AAV10-U7-hSOD1-injected SCs. Values are expressed as the mean \pm SEM, and differences between groups were analyzed by the Student's t test (**p < 0.01).

respectively (p < 0.05). However, we detected no significant difference in hSOD1 protein levels at the end stage among AAV10-U7-hSOD1-injected, AAV10-U7-CTR-injected, or NI animals, despite the significant decrease of mRNA, suggesting progressive accumulation of residual amounts of mutant hSOD1 protein in the treated mice (Figure S3B).

We investigated the possible production of a protein from the truncated SOD1 mRNA after the prolonged expression of AAV10-U7-hSOD1 in the spinal cords of SOD1^{G93A} mice injected at birth (n = 4) (Figure S4). If the Δ E2 hSOD1 mRNA is translated into protein, the latter will have a different amino acid sequence downstream of the end of exon 1 and will be made of 55 amino acids. Using the hSOD1-specific antibody, recognizing the N-terminal portion of the hSOD1

protein, we detected no protein signal at the presumed size of the truncated protein (6.05 kDa) (Figure S4A). As expected, with the same antibody, we confirmed that the levels of the hSOD1 protein were reduced by 76% in AAV10-U7-hSOD1-injected SOD1^{G93A} mice relative to those of NI mice at 112 days of age (p < 0.0001) (Figure S4B).

Double-immunofluorescence analysis of spinal cord sections using antibodies against hSOD1 and either choline acetyl transferase (ChAT) (a marker of MNs) or glial fibrillary acid protein (GFAP) (a marker of astrocytes) confirmed the reduction of hSOD1 protein levels in individual MNs from AAV10-U7-hSOD1-injected mice at 112 days of age, but also in astrocytes, another cell type involved in ALS pathogenesis²² (Figure S5).

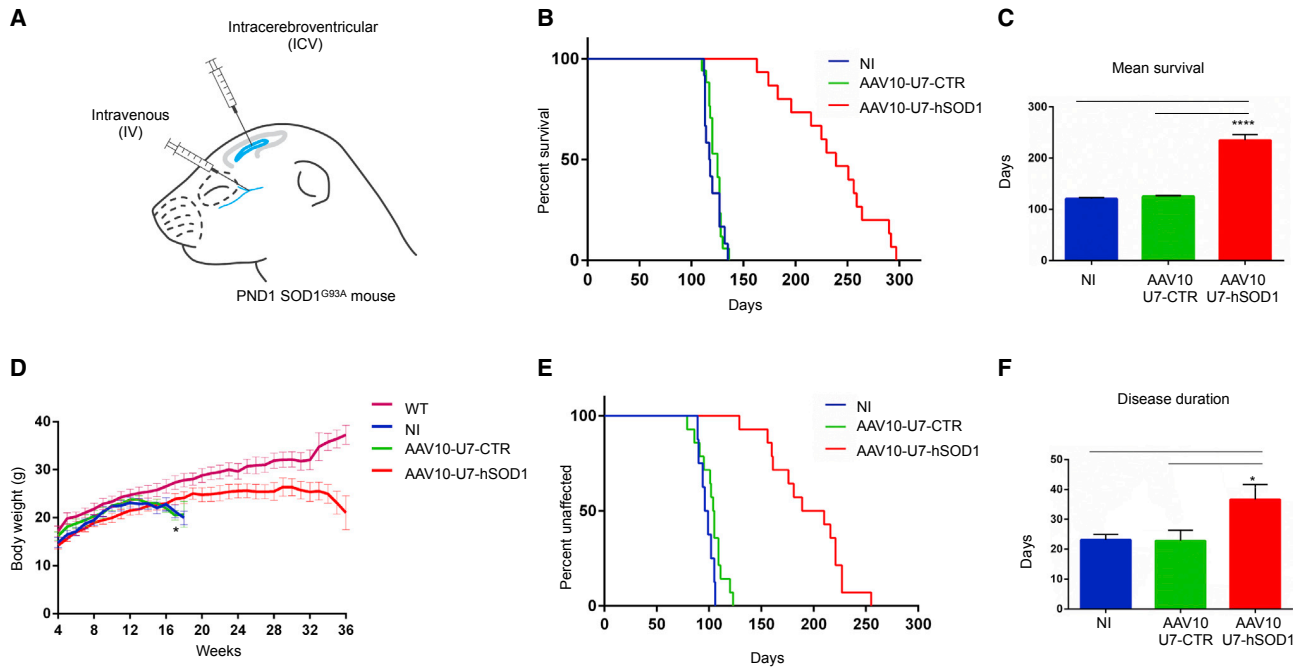


Figure 3. Combined i.v./i.c.v. Delivery of AAV10-U7-hSOD1 Prolongs Survival in Neonatal SOD1^{G93A} Mice

(A) Schematic representation of AAV10 delivery into the temporal vein (i.v.) and lateral ventricles (i.c.v.) (co-i.v./i.c.v.) of SOD1^{G93A} mice on PND1. The mice were injected with a total dose of 4.5×10^{14} vg/kg of AAV10-U7-hSOD1 or AAV10-U7-CTR vectors (i.v., 4×10^{14} vg/kg, and i.c.v., 5×10^{13} vg/kg). (B) Kaplan-Meier survival curves of SOD1^{G93A} mice co-i.v./i.c.v. injected with either AAV10-U7-SOD1 (red, n = 15) or AAV10-U7-CTR (green, n = 17) and NI mice (blue, n = 12). Differences between the curves were analyzed using the log rank Mantel-Cox test, showing a significant difference between AAV10-U7-SOD1-injected mice and either AAV10-U7-CTR-injected or NI mice (****p < 0.0001). (C) Bar graph indicating a significant difference between the mean survival of AAV10-U7-SOD1- and either AAV10-U7-CTR-injected mice or NI mice (235.6 ± 11 days versus 120.1 ± 2.3 days and 122.9 ± 1.6 days, respectively). Data are expressed as the mean \pm SEM, and differences between groups were analyzed by one-way ANOVA analysis followed by Tukey's post hoc test (****p < 0.0001). (D) Body weight curves of AAV10-U7-hSOD1-injected SOD1^{G93A} mice (red) compared to AAV10-U7-CTR-injected SOD1^{G93A} mice (green), NI SOD1^{G93A} mice (blue), and WT mice (pink) (n = 8 in each sex-balanced group, Student's t test, *p < 0.05). (E) Kaplan-Meier curves showing the significant delay in median disease onset (based on the age at body-weight peak) in mice injected with either AAV10-U7-hSOD1 (red, n = 14) relative to NI mice (blue, n = 8) and AAV10-U7-CTR-injected mice (green, n = 14). Differences between the curves were analyzed by the log rank Mantel-Cox test (****p < 0.0001). (F) Mean duration of disease of mice injected with either AAV10-U7-hSOD1 (red, n = 14) or AAV10-U7-CTR (green, n = 14) and of NI mice (blue, n = 8), showing the significant extension of disease duration in the AAV10-U7-hSOD1-treated animals. Results are expressed as the mean \pm SEM, and the differences between groups were determined by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test (*p < 0.05).

Skeletal muscles have also been shown to be involved in the pathogenesis of ALS;²³ thus, we further quantified the level of hSOD1 silencing in the *triceps* muscle. We found 40% lower hSOD1 mRNA levels in the *triceps* muscles of AAV10-U7-hSOD1-injected SOD1^{G93A} mice than in those of NI or AAV10-U7-CTR-injected mice (n = 3; p < 0.01) (Figure S6A).

We then quantified the main neuropathological features of ALS observed in SOD1^{G93A} mice, such as MN loss, astrogliosis, and microglia activation.²⁴ AAV10-U7-hSOD1 delivery significantly prevented ChAT⁺ MN degeneration at 112 days of age (11.8 ± 0.4 versus 9.7 ± 0.2 and 8.7 ± 0.2 , for NI and AAV10-U7-CTR delivery, respectively; p < 0.0001) (Figures 4A and 4B, upper panels), reduced the intensity of GFAP fluorescence (astrogliosis) (27.7 ± 1.8 versus 54.0 ± 1.9 and 49.5 ± 2.3 for NI and AAV10-U7-CTR, respectively; p < 0.001) (Figures 4A and 4B, middle panels), and decreased the number of ionized calcium-binding adaptor molecule 1 positive (Iba1⁺) micro-

glial cells (38.3 ± 2.2 versus 151.1 ± 6.0 and 138.5 ± 4.7 for NI and AAV10-U7-CTR, respectively; p < 0.0001) (Figures 4A and 4B, lower panels).

We assessed skeletal muscle denervation by analyzing the occupancy of neuromuscular junctions (NMJs) in AAV10-U7-hSOD1-injected SOD1^{G93A} mice, NI SOD1^{G93A} mice, and WT mice at 112 days by double staining of the *extensor digitorum longus* (EDL) muscles for bungarotoxin (BTX) (binding to the nicotinic acetylcholine receptor of NMJ) and neurofilament (NF) (fibrillar component of the axons) (Figure 4C). After AAV10-U7-hSOD1 injection, $64.0 \pm 3.2\%$ of endplates were innervated in SOD1^{G93A} mice, with no significant difference to WT mice ($80.3 \pm 7.0\%$) (Figure 4D, left panel). Conversely, NI SOD1^{G93A} mice presented $31.5 \pm 8.5\%$ of innervated endplates and were significantly different from both AAV-treated and WT mice (p < 0.05 and p < 0.01; respectively) (Figure 4D, left panel). Endplates'

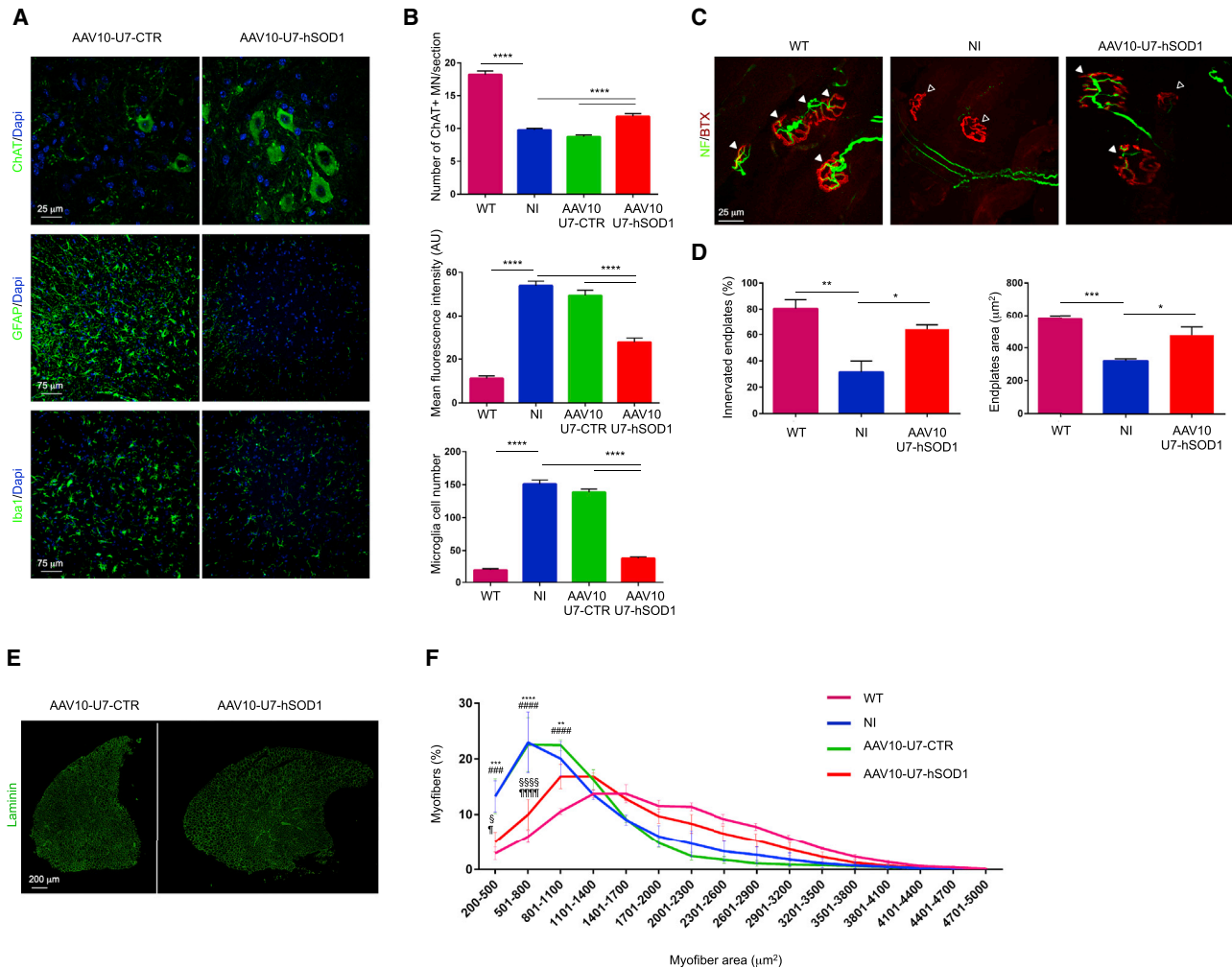


Figure 4. AAV10-U7-hSOD1 Injection in Newborn $SOD1^{G93A}$ Mice Rescues the ALS Phenotype

(A) Representative transverse sections of the ventral horn of the lumbar spinal cord from $SOD1^{G93A}$ mice injected at birth with AAV10-U7-hSOD1 or AAV10-U7-CTR and processed for immunofluorescence at 112 days of age using anti-ChAT (upper panels), anti-GFAP (middle panels), or anti-Iba1 (lower panels) antibodies. Scale bar, 25 or 75 μm , as indicated. (B) Quantitative analysis of the number of ChAT-positive motor neurons (upper panel, $n = 6$, 50 sections per mouse), the mean fluorescence intensity of GFAP immunostaining (middle panel, $n = 6$, three sections per mouse), and the number of Iba1-positive cells (lower panel, $n = 6$, three sections per mouse) in AAV10-U7-hSOD1- or AAV10-U7-CTR-injected $SOD1^{G93A}$ mice, NI $SOD1^{G93A}$ mice, and WT mice. Data are expressed as the mean \pm SEM. **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. (C) Representative NMJ of the EDL muscles from WT mice and $SOD1^{G93A}$ mice, injected at birth with AAV10-U7-hSOD1 or NI, and analyzed for whole mount immunofluorescence at 112 days. Endplates were identified by 594-conjugated BTX (red); terminal axons were identified by anti-NF antibody (green). Full arrowheads indicate innervated endplates; empty arrowheads indicate denervated endplates. Scale bar, 25 μm . (D) Quantification of innervated endplates (left panel) and endplate areas (right panel) in WT, AAV10-U7-hSOD1-injected $SOD1^{G93A}$ mice, or NI $SOD1^{G93A}$ mice ($n = 4$; ~ 50 BTX-positive endplates per animal were randomly chosen and analyzed). Data are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. (E) Representative transverse sections of the TA muscle from AAV10-U7-hSOD1- or AAV10-U7-CTR-injected $SOD1^{G93A}$ mice processed for anti-laminin immunofluorescence at 112 days of age. Scale bar, 200 μm . (F) Frequency distribution curves of myofiber areas in the TA muscle of AAV10-U7-hSOD1- or AAV10-U7-CTR-injected $SOD1^{G93A}$ mice, NI mice, and WT mice. $N = 3$ mice per group. Data are expressed as the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ for NI compared to WT; ### $p < 0.001$ and #### $p < 0.0001$ for AAV10-U7-CTR compared to WT; § $p < 0.05$ and §§§ $p < 0.0001$ for AAV10-U7-hSOD1 compared to NI; * $p < 0.05$ and **** $p < 0.0001$ for AAV10-U7-hSOD1 compared to AAV10-U7-CTR; two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test (treatment and frequency).

surface was preserved in AAV10-U7-hSOD1-injected $SOD1^{G93A}$ mice ($480.5 \pm 50.52 \mu\text{m}^2$) compared with NI and WT animals ($324.3 \pm 12.48 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$ and $580.3 \pm 17.13 \mu\text{m}^2$) (Figure 4D, right panel).

Furthermore, measurement of *tibialis anterior* (TA) muscle sections showed a 53% greater mean section area in AAV10-U7-hSOD1-treated mice ($4.6 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) than in either AAV10-U7-CTR-injected ($3.0 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$; $p < 0.05$) or NI

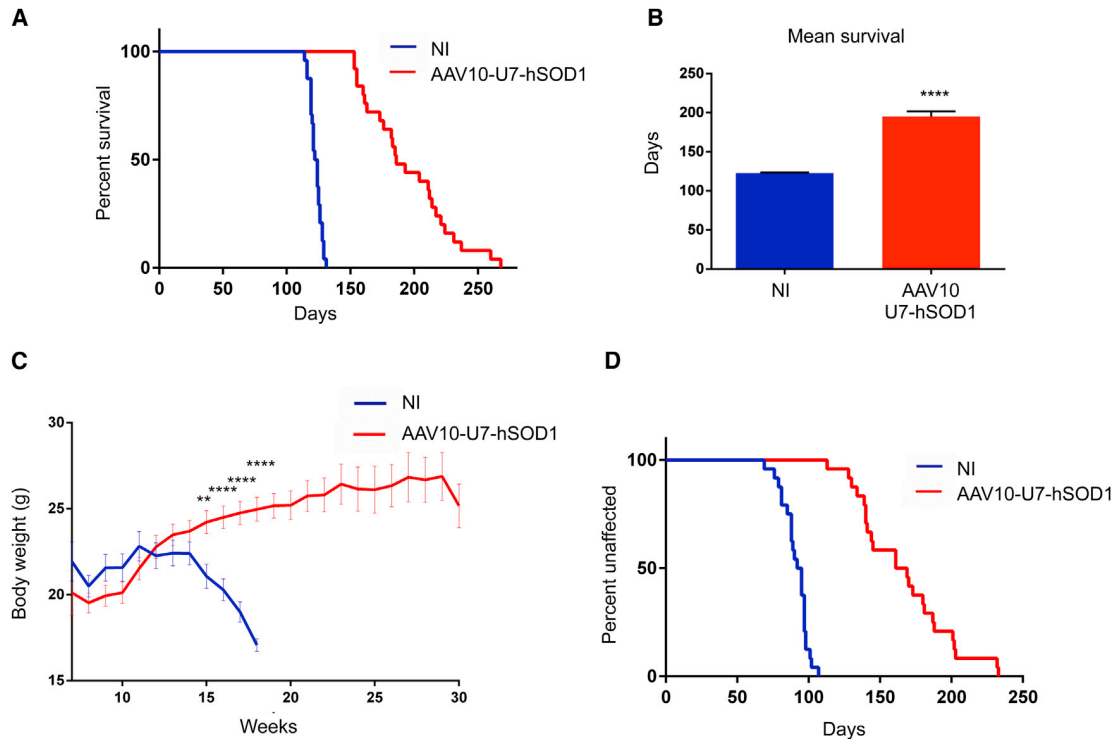


Figure 5. Combined i.v./i.c.v. Injection of AAV10-U7-hSOD1 Rescues Survival of Adult $SOD1^{G93A}$ Mice

(A) Kaplan-Meier survival curves of $SOD1^{G93A}$ mice co-i.v./i.c.v. injected at PND50 with AAV10-U7-SOD1 (4.5×10^{14} vg/kg total, $n = 25$) or NI ($n = 24$), sex-balanced group. The median lifespan was significantly longer for mice treated with AAV10-U7-hSOD1 than for NI mice (186 days versus 123 days; **** $p < 0.0001$, log rank Mantel-Cox test). (B) Comparison of the mean survival of AAV10-U7-SOD1-injected (red, $n = 25$) and NI mice (blue, $n = 24$) (195 ± 6.7 days versus 122.8 ± 0.9 days). Data are expressed as the mean \pm SEM, **** $p < 0.0001$, Student's *t* test. (C) Comparison of the body weight curves of AAV10-U7-hSOD1-injected and NI $SOD1^{G93A}$ mice ($n = 24$ per sex-balanced group). ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$, Student's *t* test. (D) Kaplan-Meier curves illustrating the onset of disease, defined by the age at the peak body weight, for AAV10-U7-hSOD1-injected (red, $n = 24$) and NI (blue, $n = 24$) $SOD1^{G93A}$ mice. The median time of disease onset was significantly delayed for the AAV10-U7-hSOD1-injected mice relative to that of NI mice. Differences between the curves were analyzed by the log rank Mantel-Cox test; **** $p < 0.0001$.

($3.0 \times 10^6 \pm 0.4 \times 10^6 \mu m^2$; $p < 0.05$) mice (Figure 4E). The frequency distribution curves of myofiber diameters, determined by anti-laminin immunofluorescence analysis, revealed a shift toward larger fibers in the TA of AAV10-U7-hSOD1-treated mice relative to controls, with a distribution of small caliber fibers similar to that of WT mice (Figure 4F). The alteration in muscle fiber composition induced by denervation²⁵ was also prevented in the AAV10-U7-hSOD1-treated $SOD1^{G93A}$ mice, as revealed by immunostaining for type IIa myosin heavy chain (MHC-IIa), representing the myosin isoform predominantly expressed in TA fast fibers of $SOD1^{G93A}$ mice, compared to type IIb or IIx MHC isoforms.²⁶ The treatment significantly reduced the number of MHC-IIa-positive fibers ($7.8 \pm 0.9\%$ of total fibers) relative to NI and AAV10-U7-CTL-injected mice ($13.0 \pm 1.2\%$ and $13.0 \pm 1.3\%$, respectively) (Figure S6B).

AAV10-U7-hSOD1-Mediated Gene Therapy Rescues 50-Day-Old ALS Mice Survival

We further investigated the potential therapeutic effects of AAV10-U7-hSOD1-mediated $SOD1$ silencing in adult mice, when muscle denervation

is already present,^{27,28} by co-i.v./i.c.v. injecting 50-day-old $SOD1^{G93A}$ mice ($n = 25$) with the vector (i.v., 4.2×10^{14} vg/kg and 3.0×10^{13} vg/kg, respectively). The median survival of AAV10-U7-hSOD1-treated mice was extended by 63 days relative to NI controls ($n = 24$) (186 days versus 123 days; $p < 0.0001$) (Figure 5A), and the mean life expectancy was extended by 58% (195.0 ± 6.7 days versus 122.8 ± 0.9 days; $p < 0.0001$) (Figure 5B). AAV10-U7-hSOD1 delivery also significantly prevented weight loss starting at 15 weeks of age in NI $SOD1^{G93A}$ mice (24.2 ± 0.6 g versus 21.0 ± 0.6 g, $p < 0.01$) (Figure 5C). Disease onset was delayed by 71.5 days in the AAV10-U7-hSOD1-injected mice relative to the NI mice (165.0 days versus 93.5 days; $p < 0.0001$) (Figure 5D). There was no significant increase in the duration of disease progression between AAV10-U7-hSOD1-injected mice and NI mice (31.7 ± 1.8 days and 28.2 ± 3 days, respectively; $p = 0.33$).

Widespread AAV10-U7-hSOD1-Mediated hSOD1 Suppression Delays Disease Signs in Adult $SOD1^{G93A}$ Mice

We observed a significant reduction of hSOD1 mRNA and protein levels in both the CNS and peripheral organs of mice injected with

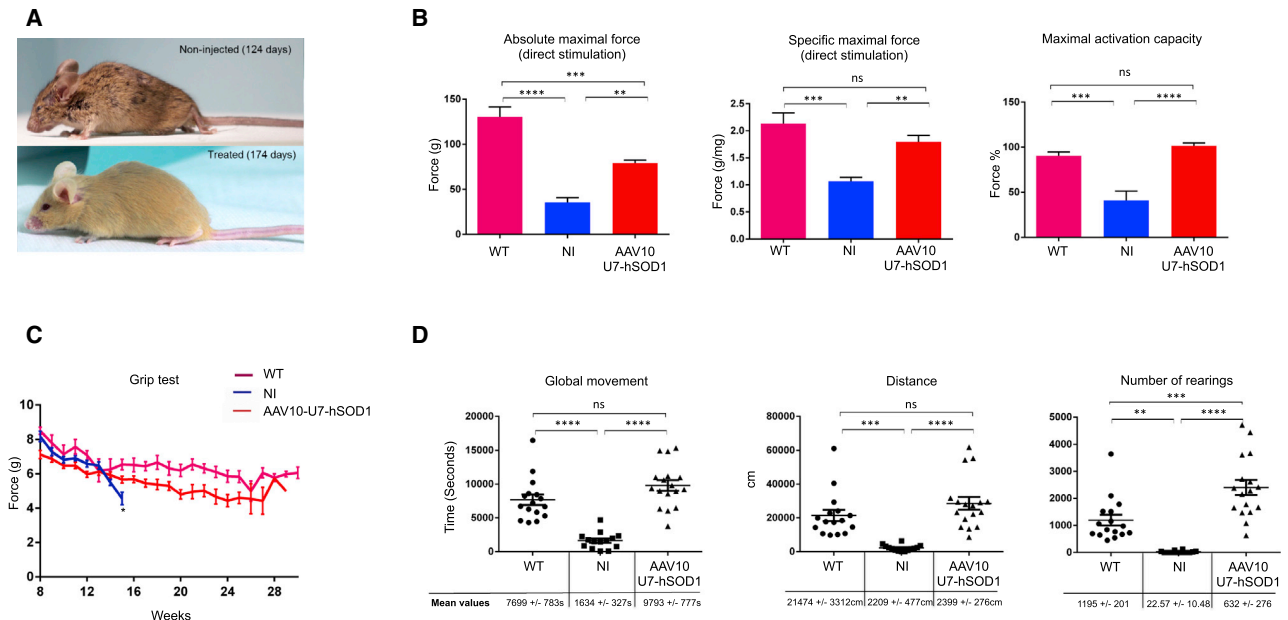


Figure 6. Combined i.v./i.c.v. Injection of AAV10-U7-hSOD1 Preserves Neuromuscular Function in Adult SOD1^{G93A} Mice

(A) Photographs illustrating the phenotype of a NI SOD1^{G93A} mouse at 124 days of age displaying kyphosis, closed eyes, self-grooming defects, and lower limb paralysis (upper panel), and of a 174-day-old AAV10-U7-hSOD1-injected SOD1^{G93A} mouse (whose phenotype was similar to WT mice) (lower panel). (B) Absolute and specific maximal forces in response to muscle stimulation (direct stimulation), and maximal activation capacity that was a functional index of neuromuscular transmission measured in 112-day-old AAV10-U7-hSOD1-injected SOD1^{G93A} mice, age-matched WT mice, and 112-day-old NI SOD1^{G93A} mice (n = 3 per group). Data are expressed as the mean ± SEM. **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. (C) Grip strength was assessed twice a week from the day of treatment in injected (red) and NI (blue) SOD1^{G93A} mice (n = 24 per group) as well as in age- and sex-matched WT animals (pink, n = 10). Data are expressed as the mean per week ± SEM. The difference between injected and NI mice was statistically significant at 15 weeks of age (*p < 0.05, Student's t test). (D) Spontaneous motor activity monitored during 12 hr overnight in AAV10-U7-hSOD1-injected (n = 17), NI SOD1^{G93A} mice (n = 14), and WT mice (n = 16) (sex-balanced groups) at 120 days of age. The analyzed parameters were the time spent moving (left panel), distance covered (middle panel) (cm), and number of rearings (right panel). Individual data for WT (circles), NI (squares), and AAV10-U7-hSOD1 (triangles) are indicated, as well as the mean values ± SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

AAV10-U7-hSOD1 at the age of 50 days (n = 3) relative to NI mice (n = 3) (Figure S7), similar to the results of SOD1^{G93A} mice injected at birth and confirming the consistent targeting of multiple tissues. Histopathological analysis of the spinal cord and TA muscle in SOD1^{G93A} mice injected at the age of 50 days also showed 35% more MNs relative to age-matched NI mice (Figure S8A) and a total area and frequency distribution of the myofiber area in the TA muscle that was similar to that of WT mice (Figure S8C).

The overall phenotype of the treated SOD1^{G93A} mice was considerably improved relative to that of NI mice, as illustrated in Figure 6A, with 36% of SOD1^{G93A}-treated mice never showing signs of hind-limb paralysis. When present, the duration of paralysis, calculated as the time from muscle rigidity onset to death, was significantly extended by the treatment (16.7 ± 2.7 days versus 10.0 ± 1.4 days in NI; p < 0.05; Student's t test), although there was no increase in disease duration in the AAV10-U7-hSOD1-injected mice, suggesting a potential beneficial effect of the treatment on muscle innervation.⁹ This was confirmed by the observation of NMJ protection in the *gastrocnemius* muscle of SOD1^{G93A} mice injected with AAV10-U7-hSOD1 at 50 days relative to NI SOD1^{G93A} mice (48.0 ± 2.5% versus

16.0 ± 2.0% of innervated endplates; p < 0.001; Student's t test) (Figure S8B).

A further comparison of the contractile properties of the TA muscle from AAV10-U7-hSOD1-injected and NI mice confirmed the impact of hSOD1 silencing on neuromuscular function. The absolute maximal force generated during isometric TA muscle contraction after direct stimulation of the TA muscle of 112-day-old AAV10-injected mice was double that of NI mice (79.2 ± 3.1 g versus 35.6 ± 5.1 g; respectively, p < 0.01), but still lower than that of WT mice (130.5 ± 10.0 g, p < 0.001) (Figure 6B, left panel). However, when the absolute force was normalized to muscle mass, the specific maximal force was 69% greater in treated than in NI mice (1.8 ± 0.1 g versus 1.1 ± 0.1 g; p < 0.01) with no statistically significant difference from that of WT mice (2.1 ± 0.1 g) (Figure 6B, middle panel). Moreover, the maximal activation capacity of the TA muscle (defined as the percentage of force generated in response to sciatic nerve stimulation relative to muscle stimulation) was more than 100% higher in treated mice than in NI controls (101.6 ± 3.1 versus 41.2 ± 10.0; p < 0.0001), and was not different from that of WT mice (90.3 ± 11.0) (Figure 6B, right panel), demonstrating the functional maintenance of neuromuscular transmission and functional force generation.

We confirmed the beneficial effect of AAV10-U7-hSOD1 on neuromuscular function by analyzing muscle strength in a grip test, showing the maintenance of muscle force over the lifespan of treated mice that had a significantly greater grip force than did NI mice (5.6 ± 0.2 g versus 4.5 ± 0.3 g, $p < 0.05$) and no statistically significant difference from that of WT mice (6.5 ± 0.3 , NS), at 15 weeks of age (Figure 6C). The analysis of spontaneous motor activity in an actimeter also showed the complete rescue of the overall activity of the treated mice, which was significantly greater than that of NI mice and similar to that of WT mice (Figure 6D; Movie S1). In contrast, motor coordination of the SOD1^{G93A} mice measured by the rotarod test was only partially restored by AAV10-U7-hSOD1 delivery because the latency to fall of the injected mice was still significantly higher than that of NI mice at 15 weeks of age (31.0 ± 3.3 s versus 21.4 ± 2.2 s, $p < 0.05$), but remained lower than that of WT mice (59.2 ± 2.6 s; $p < 0.0001$) (Figure S9).

DISCUSSION

In summary, we showed the efficacy of a new gene therapy approach for silencing mutant hSOD1 expression throughout the body of SOD1^{G93A} mice by AAV10 delivery of a U7-AS construct that functionally skips exon 2 of hSOD1 out of frame. Survival and the results of functional tests exceeded any reported results from previous hSOD1-silencing approaches. This increased effect is likely due to the combination of a more efficient gene-silencing method and the targeting of both central and peripheral tissues.

The reduction in mutant SOD1 levels induced by AAV10-mediated exon skipping was much greater than those reported in previous studies using AAV9- or AAV10-mediated RNA interference,^{10,11,13} with a nearly 70% reduction of hSOD1 protein levels in the spinal cord.

This effect is most likely due to the use of U7-delivered antisense molecules, acting at the pre-mRNA level and hampering the formation of a full-length hSOD1 mRNA and its toxic product. To establish whether the described exon-skipping approach outperforms RNA-interference techniques (artificial miRNA or short hairpin RNA), a direct comparison of the different molecular strategies tested under the same conditions (e.g., same amount of vectors and delivery route) is needed. These studies will be helpful to identify the best method for hSOD1 reduction in vivo.

Moreover, co-delivery of the therapeutic vector into the cerebrospinal fluid and bloodstream resulted in efficient SOD1 silencing in tissues known to be involved in SOD1^{G93A}-mediated toxicity, including MNs and glial cells in the spinal cord²⁴ and skeletal muscle fibers.²³ Appropriate biodistribution studies, determining the histotypes targeted by the co-i.v./i.c.v. delivery of AAV10, will enable the identification of the specific cell populations responsible for the therapeutic effect. This will be possible in the immediate future, taking advantage of a tagged AAV10-U7-hSOD1 co-expressing the AS molecules and a reporter gene.

Unlike chemically modified ASOs, for which the short lifetime requires their regular re-injection and which can cause toxicity,^{7,29} our AAV-U7 strategy to deliver AS molecules allows sustained therapeutic effects in injected animals and reduction of neuroinflammatory signs. The loco-regional delivery of an AAV-U7-mediated exon skipping approach is currently in clinical development for the restoration of truncated dystrophin in patients with Duchenne muscular dystrophy, and the first preclinical results showed a good safety profile in large animals.^{30,31} The therapeutic effect observed in our study could also be due to the high AAV dose used (4.5×10^{14} vg/kg), initially tested in proof of concept studies in newborn mice and then scaled up in adult mice. Indeed, thanks to the combination of the two delivery routes (i.c.v. and i.v.), it was possible to inject larger AAV quantities compared to studies in which the two delivery routes were used independently. Dose-finding studies will be necessary to determine the optimal AAV dosage for the translation of this therapy in large animals before translation to humans. Results from both preclinical and clinical studies showed that higher doses allow better therapeutic effects in neuromuscular disorders (C. Le Guiner, personal communication; J.R. Mendell et al., 2016, Am. Soc. Gene Cell Ther., conference),³² but difficulties to manufacture high vector doses and potential immunotoxicity remain obstacles to overcome the development of whole-body rescue strategies.

The efficacy and the clinical feasibility of our innovative SOD1-silencing approach highlights its considerable and realistic potential for ALS treatment, although some concerns regarding safety and the regulatory process of the combined central and peripheral mode of AAV delivery should be considered. The therapeutic translation of this strategy could thus benefit from a direct comparison of the three administration routes, namely, i.v., i.c.v., and co-i.v./i.c.v., using equal AAV doses. This will imply the injection of highly concentrated AAV productions to respect the volume limitations in brain ventricles compared to those of the bloodstream.

The use of AAV in clinical and preclinical studies has demonstrated transgene expression for several years.^{33,34} Furthermore, to prolong the AAV-mediated therapeutic effect, different strategies are currently developed to allow vector re-administration and escape to the immune response, such as exosome-embedded AAVs³⁵ or the use of tolerogenic nanoparticles.³⁶ In our study, we appreciated the prolonged AAV-mediated effect on hSOD1 mRNA at the end stage of treated animals (more than 250 days), although the major part of treated animals died developing progressive signs of limb paralysis. This finite therapeutic effect observed in treated SOD1^{G93A} mice is likely due to the accumulation of a residual amount of protein produced by the unskipped mRNA, attributable to the described prion-like properties of mutant hSOD1.^{37,38} Complete SOD1 suppression could be achieved by combining several U7-AS cassettes, as recently described by Schümperli and colleagues³⁹ for SMA or by coupling other methods to suppress SOD1, such as RNA interference or single chain antibodies⁴⁰ counteracting protein aggregation.

One-third of treated mice died from atypical ALS, without any sign of classical limb paralysis, rather showing a weight loss phenotype without ambulatory alterations, similar to the phenotype described by Stoica et al.¹³ This variability within the treated group could be due to stochastic distribution of the vector, which could have preferentially preserved limb motor units for yet unknown reasons.

The antisense sequences injected in SOD1^{G93A} mice were able to specifically silence hSOD1, without affecting endogenous SOD1 levels, thanks to the presence of ten mismatches between the human and mouse sequences. Such discrimination will not be possible in man because the described exon-skipping method will not distinguish between the product of the mutant or WT allele. Consequently, hSOD1 exon skipping could be virtually applied to all patients with SOD1 mutations, demonstrating SOD1 accumulation. Whether the partial knockdown of functional SOD1 is detrimental to normal cellular physiology is still a controversial matter.⁴¹ SOD1 knockout mice do not develop evident pathological phenotypes,⁴² and the first clinical trial using infused ASO against total hSOD1 has proven safe.⁷ The use of in vitro models, such as induced pluripotent stem-cell-derived motor neurons,⁴³ could help in the identification of potential toxic manifestations after such treatment. Moreover, a possible therapeutic solution to solve this problem would be to co-administer with the AAV10-U7-hSOD1, an antisense-resistant SOD1 coding sequence.

Interestingly, AAV10-U7-mediated exon 2 skipping mimicked a natural event observed in a Canadian SOD1-linked ALS family, carrying a heterozygous or homozygous deletion in a specific ESE sequence of SOD1 E2.⁴⁴ In this family, natural skipping of E2 reduced transcription of the mutant SOD1 allele, explaining the low penetrance of the mutation. This mutation was found in ALS patients or carriers who had low levels of toxic hSOD1 protein and were either weakly affected or unaffected.⁴⁴ In these patients, an exon 3 skipped form, which was never detected in our experiments, was observed.

When we tested the ASO in vitro, we observed some variability in exon-skipping efficacy. In some experiments, such as in the one shown in Figure S1B, the Δ E hSOD1 mRNA was much more evident in ASO2-treated cells relative to ASO1-treated cells. The thorough qPCR analysis on total mRNA levels (Figure 1B) showed a major efficacy in reducing the full-length RNA by the ASO1 sequence that was chosen for in vivo testing. One possible explanation for the lack of correspondence between the presence of the skipped form and the full-length hSOD1 mRNA reduction could involve other mechanisms than nonsense-mediated decay, such as nuclear RNA surveillance pathways for decay, as described by Ward et al.¹⁴ in the example of STAT3 exon skipping.

To evaluate SOD1 knockdown, we used an antibody recognizing the N-terminal region of the human SOD1 protein. The specific epitope is unknown and could detect some amino acids within exon 2. In this case, the effect on the protein would be attributed to the lack of a specific portion of the protein rather than to total suppression of hSOD1 protein. To corroborate the observed effect on protein suppression,

we performed western blot analysis with an antibody raised against the full recombinant protein and confirmed the SOD1 suppression of the total protein in AAV10-U7-hSOD1-injected mice (Figure S10).

Different studies have suggested the involvement of WT SOD1 misfolding in sporadic ALS,^{22,45,46} but this involvement was not confirmed by one recently published study.⁴⁷ Thus, the therapeutic application of AAV10-U7-mediated exon skipping may not be limited to the 12% of fALS patients who present with SOD1 mutations, but may also be applicable to some sporadic patients when hSOD1 accumulation is confirmed. This gene-silencing strategy could further be applied to a number of neurological disorders caused by “gain-of-function” gene mutations. In particular, because an U7-AS therapy has been demonstrated to be effective in the context of a trinucleotide repeat expansion pathology, namely Myotonic dystrophy type 1,⁴⁸ we can speculate that it could be further applied to other diseases caused by repeated nucleotide expansion and in particular to another form of ALS not linked to SOD1, the most common form of dominantly inherited ALS linked to C9orf72 mutations⁴⁹ caused by hexanucleotide repeat expansion.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Animals were maintained following the European guidelines for the care and use of experimental animals and approved by the Charles Darwin N.5 Ethics Committee on Animal Experiments (agreement number 04830.02). High copy SOD1^{G93A} mice, B6SJL-Tg (SOD1*G93A)1Gur/J (JACKSON SN 2726⁵⁰), were purchased from Jackson Laboratory. The *Colony Management Considerations* published in “Working with ALS Mice” were taken into account for the maintenance of the strain. SOD1^{G93A} mice were genotyped by PCR and assessed for hSOD1 genome copy number. To take into account the effect of gender on disease progression,⁵¹ sex-balanced groups of animals were injected.

AON Design

ESE *finder* 3.0 software⁵² was used to determine the ESEs in E2 of hSOD1. This software can predict binding sites for the most abundant SR proteins (SF2/ASF, IgM-BRCA1, SC35, SRp40, and SRp55). The consensus sequence for the SA was identified in the first hSOD1 intron. Five RNA-based ASOs masking these sequences on hSOD1 pre-mRNA were rationally designed. The ASOs were designed following the specific rules published by Aartsma-Rus et al.⁵³ and using the *RNAstructure* 5.3 software. Each ASO was designed to be 20 nt long and to have the highest melting temperature (T_m) and the highest binding energy between the ASO and the target E2 sequence. ASO 1: 5'-CCCACACCUUCACUG GUCCA-3'; ASO 2: 5'-GGCCUUCAGUCAGUCCUUUA-3'; ASO 3: 5'-CUGGUCCAUUACUUUCCUUU-3'; ASO 4: 5'-CCAUGCAG GCCUUCAGUCAG-3'; and ASO 5: 5'-CUGCUGUAUUAUCUCCA AAC-3'. A scrambled ASO sequence was also selected as a negative control (ASO-CTR: 5'-GCUCAUUCGCUUUCUUCU-3').

Cell Transfections

HEK293T cells were cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO₂ and

2'-O-methyl phosphorothioate (2'OMePS) ASOs were purchased from Eurogentec and re-suspended in H₂O RNase-free water at a final concentration of 1 µg/µL. Cells were transfected with 5 µg of each ASO with Oligofectamine (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The cells were harvested, 48 hr after transfection, for RNA extraction.

AAV Productions

The DNA sequences corresponding to the two best-performing ASOs were juxtaposed and cloned into pAAVsc_U7DTEX23 (kindly provided by GENETHON) using PCR-mediated mutagenesis, as previously described.²⁰ The scAAV serotype 10 vectors were produced using the tri-transfection method, as described in Dominguez et al.⁵⁴ Vector titers were determined by qPCR on ITRs and expressed as vg/mL.

AAV Injections

SOD1^{G93A} mice of 50 days of age were used for direct injection into the lumbar spinal cord. Mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of a ketamine/xylazine mixture (100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine; 0.1 mL per 20 g of body weight). Injections were performed as reported by Raoul et al.⁸, and a total volume of 10 µL (two sites, 5 µL per site) containing 9.5×10^{10} vg (4.7×10^{12} vg/kg) of each vector was injected *per mouse*.

Combined i.c.v. and i.v. injections were performed in newborn mice with a total of 7.8×10^{11} vg (4.5×10^{14} vg/kg). Each mouse was injected with 70 µL of vector solution in the temporal vein and 10 µL in the lateral ventricles (unilateral injection, coordinates: -1 mm anterior-posterior, ± 1mm medio-lateral, and -1 mm dorso-ventral from bregma) using a Hamilton syringe (32G and 30-mm length needle).

A total of 7.8×10^{12} vg (4.5×10^{14} vg/kg) was administered to 50-day-old adult mice using the combined i.c.v. and i.v. delivery route. A roughly 20 µL viral suspension was stereotactically injected into the lateral ventricles (-0.2 mm anterior-posterior, ± 1 mm medio-lateral, and -1.8 mm dorso-ventral from bregma). An average of 320 µL of viral solution was injected into the tail vein or the retrobulbar sinus using an insulin syringe (29G, Terumo).

RT-PCR and qPCR Analyses

For in vivo analyses of mRNA levels, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (200 mg/kg, Imalgene, Merial) and xylazine (20 mg/kg, Rompun 2%, Bayer) at 112 days of age or at the end stage and transcardially perfused with PBS. Tissues (spinal cord, skeletal muscle, forebrain, brain stem, cerebellum, liver, and heart) were removed, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

Total RNA was extracted either from frozen tissues or transfected HEK293 cells using the NucleoSpin RNA II RNA extraction kit (Macherey-Nagel) and quantified with a DeNovix DS-11 spectrophotometer.

For RT-PCR analyses, cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using oligo (dT) and random hexamer primers, according to the

iScript cDNA Synthesis kit protocol (Bio-Rad). E2 skipping in the hSOD1 mRNA was revealed by RT-PCR analysis of 200 ng of cDNA using the following primers (Eurogentec):

Primer Fw1, matching the hSOD1 exon 1: 5'-CTAGCGAGT TATGGCGAC-3';

Primer Rev 4/5, matching the hSOD1 exon 4-exon 5 boundary: 5'-GCCAATGATGCAATGGTCTC-3'.

For qRT-PCR (qPCR) analyses, cDNA was synthesized from 200 ng of RNA using the High Capacity cDNA RT Kit (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Amplified cDNA (30 ng) was mixed with 10 µL of Taqman Universal PCR Master Mix II - 2X (Life Technologies) and 1 µL of FAM probe for hSOD1 (TaqMan Gene expression assay Hs00533490m1, Life Technologies). For in vitro studies, 1 µL of VIC probe for human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Taqman Gene expression assay Hs03929097_g1, Life Technologies) was used as endogenous control, and for in vivo analysis, 1 µL of VIC probe for mouse hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (Taqman gene expression assay Mm00446968_m1, Life Technologies) was used as endogenous control. Each sample was deposited in triplicate in a 96-well plate (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were: 1 min at 60°C and 10 min at 95°C, followed by 39 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C in the StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems).

The relative quantity of hSOD1 mRNA was calculated using the delta Ct/delta Ct method, taking into account the PCR signal of the target gene transcript of each sample (normalized to the endogenous control) relative to that of the control sample. The qPCR analyses were performed with the StepOne software v2.3 (Life Technologies).

Western Blot Analyses

Protein extracts from cells or freshly frozen tissues (see above) were prepared using a lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP40, and 0.1% SDS) supplied with a protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche Diagnostics). Protein lysates were quantified using the DC protein assay kit (BioRad). 15-µg proteins (except for western blot in Figure S4) were separated on a 12% polyacrylamide gel (Criterion XT 12% bis-Tris, Bio-Rad) and analyzed by western blot using anti-α-tubulin (T5168, Sigma-Aldrich), anti-actin (A2066, Sigma-Aldrich), anti-human SOD1 (sc-8636, Santa Cruz Biotechnology), and anti-human SOD1 (556360, BD Pharmingen) antibodies. Peroxidase-conjugated mouse (VWR), rabbit (VWR), or goat (Life Technologies) immunoglobulin (Ig) antisera were used as secondary antibodies. Western blots were developed using the SuperSignal West Dura kit (Life Technologies), and densitometric analyses were performed using ImageJ software.

Histological Analyses and Microscopy

Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg, Imalgene, Merial) and xylazine (10 mg/kg, Rompun

2%, Bayer) at 112 days of age or at the end stage and transcardially perfused with PBS. The TA and *gastrocnemius* muscles were removed and perpendicularly or horizontally, respectively, placed on a cork support with tragacanth, frozen in cold isopentane, and stored at -80°C . Mice were then perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich) in PBS. The spines were explanted and stored in 4% PFA at $+4^{\circ}\text{C}$ for at least 24 hr, then transferred into a PBS-sucrose solution (30%) and stored for at least 24 hr at 4°C . Spinal cords were extracted, embedded in Tissue-Tek (OCT; Sakura Finetek), and frozen in cold isopentane (between -45°C and -50°C). 14- μm -thick sections were serially cut from the whole spinal cord at -22°C .

8- μm -thick cryosections were serially cut from TA muscles using a cryostat (Leica Microsystems) at -24°C , starting from the proximal origin, and stored at -80°C . Cryosections were fixed with 4% PFA and permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS. Only spinal cord sections were also subjected to antigen retrieval with citrate buffer (10 mM citric acid, pH 6) at 85°C . Non-specific epitopes were blocked in a solution containing 5% BSA (IgG free, protease free, Jackson Laboratory), 0.1% Triton X-100 and 10% normal donkey serum (Millipore) (for ChAT), 10% normal goat serum (Life Technologies) (for GFAP, Iba1, hSOD1, and Laminin), or 1% FBS (Life Technologies) (for Ila-MHC) in PBS. The following primary antibodies were used in the corresponding blocking solution overnight at $+4^{\circ}\text{C}$: goat anti-ChAT (1:50; AB144P); rabbit anti GFAP (1:250; Dako #Z033401); rabbit anti-Iba1 (1:400, Wako #019-19741); mouse anti-hSOD1 (1:100, BD Pharmigen #556360), rabbit anti-Laminin (1:400; Sigma-Aldrich #L9393), and mouse anti-MHC-IIa (undiluted SC-71, DSHB #AB2147165). After washing, tissues were incubated with the appropriate fluorescent-conjugated secondary antibodies: donkey anti-goat 488 (1:750, Life Technologies # A-11055, for ChAT), goat anti-rabbit 488 (1:750, Life Technologies # A-11008, for GFAP, Iba1, and Laminin), goat anti-mouse 594 (1:200, Life Technologies # A-11005 for hSOD1), or goat anti-mouse Cy3 (1:400, Jackson #115165206 for MHC-IIa), combined with DAPI staining (1:5,000, Sigma-Aldrich). Slides were mounted with FluoroMount-G Mouning Medium (Interchim).

Skeletal muscle images were obtained using an epifluorescence microscope (Leica Camera AG), digitized with a Nikon camera, and acquired using MetaMorph software. Spinal cord images were obtained using a Leica SPE confocal microscope (Leica Camera AG). Photographs were contrast enhanced by applying the brightness/contrast regulation of the Photoshop CS 8.0 software (Macintosh version, Adobe). Double immunofluorescence images were obtained by superimposing two or three single-color images of the same field.

ChAT-positive motor neurons (with a diameter $>20\ \mu\text{m}$) were manually counted in the ventral horn of the cervical, thoracic, and lumbar spinal cord segments using an epifluorescence microscope (Leica Camera AG). Astroglial activation was evaluated by measuring the fluorescence intensity of the GFAP staining in the gray matter of the spinal cords using ImageJ software. Microglial activation was evaluated by counting the Iba-1-positive cells in the gray matter of spinal

cord sections. The myofiber area and number were quantified using ImageJ software. Fiber areas were calculated in square pixels and then converted into μm^2 . Cell counting and morphological analyses were performed in a blinded manner.

NMJ Analysis

For whole-mount staining of the EDL muscles, the protocol described in the SOP SMA.M_1.2.003 of "Treat-NMD neuromuscular network" was used with slight modifications. EDL muscles were freshly explanted, washed in PBS, and incubated on a rotating shaker (Stuart rotator SB3) for 10 min in a solution containing 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of 594-conjugated BTX (Life Technologies # B-13423) in PBS. After PBS washings, muscles were fixed with 4% PFA in PBS for 15 min and dissected under a stereomicroscope (Zeiss). Non-specific epitopes were blocked in a solution containing 5% BSA, 0.1% Triton X-100, and 10% normal goat serum for 30 min. The monoclonal antibody anti-NF (1:200, MAB5254) was incubated overnight at $+4^{\circ}\text{C}$. After washings, EDL muscles were incubated with goat anti-mouse 488 (1:200, Life Technologies A-21121) and mounted on slides with FluoroMount-G.

20- μm -thick cryosections were serially cut from *gastrocnemius* muscles using a cryostat at -24°C and stored at -80°C . Sections were fixed with cold acetone, incubated with 594-conjugated BTX, and then processed for anti-NF immunofluorescence, as described above.

Fluorescence images along the z axis were taken by a Leica SPE confocal microscope. Z stacks were done using ImageJ software, and images were processed as described above. Endplates were scored as innervated when BTX and NF signals co-localized and were scored as denervated if they showed only BTX staining. Endplate areas were measured using ImageJ software and were calculated in square pixels and then converted into μm^2 .

Analyses of Muscle Contractile Properties

Absolute maximal force, specific maximal force, and maximal activation capacity were evaluated by measuring the in situ isometric muscle contraction of the TA in response to nerve stimulation (as described by Ferry et al.⁵⁵). Mice were anesthetized by intraperitoneal administration of a pentobarbital solution (60 mg/kg). The knee and foot were fixed with clamps and stainless steel pins, and the distal tendon of the TA muscle was attached to an isometric transducer, dual-mode lever (Aurora Scientific) using a silk ligature, under constant tension. Force responses to muscle and nerve electrical stimulation (square wave pulses of 0.1-ms duration, pulse frequency of 75–150 Hz, and stimulation train of 500 ms) were successively recorded. Absolute maximal isometric force was determined at optimal length (length at which maximal tension was obtained during the tetanus) and then normalized to the muscle mass to estimate specific maximal force. We also compared the maximal tetanic force produced following stimulation of either the sciatic nerve or the muscle directly. If neuromuscular transmission is impaired, indirect muscle stimulation would be expected to produce lower maximal tetanic

force values than when the muscle is stimulated via the nerve. In this study, we used this comparison as a functional index of the capacity of the neuromuscular transmission to maximally activate the muscle (maximal activation capacity).

Behavioral Analyses

Body weight, strength, motor coordination, and spontaneous activity were assessed twice a week. The grip strength of the four limbs was evaluated using a grip strength meter (Bioseb) to determine the peak force (in grams) generated when the mouse is pulled back from a metal grid. For each test, five measures per animal were recorded. Motor coordination was assessed using an accelerating rotarod instrument (Bioseb), starting at 4 rpm/min. The time spent on the rotarod before falling was recorded in two runs per animal. At 17 weeks of age, the spontaneous activity of mice was assessed overnight (12 hr) using an actimeter to record the number of crossed infrared light beams, and data were analyzed using Track software (Bioseb).

Survival was determined as the time when the mouse was unable to right itself in 30 s when placed on its side (defined as the end stage).

Statistical Analyses

Statistical significance was assessed using the Student's paired t test, one-way ANOVA, or two-way ANOVA, depending on the experimental protocols, as stated in the figure legends. Survival and disease-onset curves were compared using the log-rank Mantel-Cox test. Results were considered to be significant for p values under 0.05. All statistical tests were performed using Prism software (version 4.0, GraphPad). The therapeutic study of AAV-U7-hSOD1 delivery in adult SOD1^{G93A} mice was designed following the *Prize4Life* criteria and the recommendations published by Scott et al.⁵⁶

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes ten figures and one movie and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.05.017>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.G.B. and M.B. planned, designed, interpreted the experiments, and wrote the manuscript. T.V. intellectually contributed to the study and supervised the revision process. M.G.B., M.C.-T., C.B., and A.C. carried out experiments. M.G.B., M.R., B.G., and T.M. maintained the animals and performed behavioral analyses and injections. M.C.-T. and S.A. produced the AAV vectors. A.F. performed the electrophysiological analyses.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors sincerely thank Bruno Cadot (Center of Research in Myology) for his help in microscopy image acquisition, Yannick Tanguy for taking the mouse photographs and help in the statistical

analyses, Aurore Besse for her technical assistance, and Ilaria Di Emidio for the illustrations. We also thank G. Haase and M. Crescenzi for critical reading of the manuscript. This work was funded by the Association Française contre les Myopathies (AFM), the University Pierre et Marie Curie (UPMC), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Association Institut de Myologie (AIM), the Otto per Mille Waldensian Church, and the Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique (ARSLA). T.V. is supported by the NIHR GOSH Biomedical Research Centre.

REFERENCES

1. Pasinelli, P., and Brown, R.H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 710–723.
2. Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V.; ALS/Riluzole Study Group (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 330, 585–591.
3. Renton, A.E., Chiò, A., and Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* 17, 17–23.
4. Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
5. Scarrott, J.M., Herranz-Martín, S., Alrafiah, A.R., Shaw, P.J., and Azzouz, M. (2015). Current developments in gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 935–947.
6. Smith, R.A., Miller, T.M., Yamanaka, K., Monia, B.P., Condon, T.P., Hung, G., Lobsiger, C.S., Ward, C.M., McAlonis-Downes, M., Wei, H., et al. (2006). Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* 116, 2290–2296.
7. Miller, T.M., Pestronk, A., David, W., Rothstein, J., Simpson, E., Appel, S.H., Andres, P.L., Mahoney, K., Allred, P., Alexander, K., et al. (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol.* 12, 435–442.
8. Raoul, C., Abbas-Terki, T., Bensadoun, J.C., Guillot, S., Haase, G., Szulc, J., Henderson, C.E., and Aebischer, P. (2005). Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat. Med.* 11, 423–428.
9. Ralph, G.S., Radcliffe, P.A., Day, D.M., Carthy, J.M., Leroux, M.A., Lee, D.C., Wong, L.F., Bilsland, L.G., Greensmith, L., Kingsman, S.M., et al. (2005). Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat. Med.* 11, 429–433.
10. Foust, K.D., Salazar, D.L., Likhite, S., Ferraiuolo, L., Ditsworth, D., Ilieva, H., Meyer, K., Schmelzer, L., Braun, L., Cleveland, D.W., et al. (2013). Therapeutic AAV9-mediated suppression of mutant SOD1 slows disease progression and extends survival in models of inherited ALS. *Mol. Ther.* 21, 2148–2159.
11. Wang, H., Yang, B., Qiu, L., Yang, C., Kramer, J., Su, Q., Guo, Y., Brown, R.H., Jr., Gao, G., and Xu, Z. (2014). Widespread spinal cord transduction by intrathecal injection of rAAV delivers efficacious RNAi therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 23, 668–681.
12. Borel, F., Gernoux, G., Cardozo, B., Metterville, J.P., Toro Cabreja, G.C., Song, L., Su, Q., Gao, G.P., Elmallah, M.K., Brown, R.H., Jr., et al. (2016). Therapeutic rAAVrh10 mediated SOD1 silencing in adult SOD1(G93A) mice and nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 27, 19–31.
13. Stoica, L., Todeasa, S.H., Cabrera, G.T., Salameh, J.S., Elmallah, M.K., Mueller, C., Brown, R.H., Jr., and Sena-Esteves, M. (2016). Adeno-associated virus-delivered artificial microRNA extends survival and delays paralysis in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Ann. Neurol.* 79, 687–700.

14. Ward, A.J., Norrbom, M., Chun, S., Bennett, C.F., and Rigo, F. (2014). Nonsense-mediated decay as a terminating mechanism for antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* *42*, 5871–5879.
15. Chang, Y.F., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 51–74.
16. Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 285–298.
17. Nagy, E., and Maquat, L.E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 198–199.
18. Yoo, B.H., Bochkareva, E., Bochkarev, A., Mou, T.C., and Gray, D.M. (2004). 2'-O-methyl-modified phosphorothioate antisense oligonucleotides have reduced non-specific effects in vitro. *Nucleic Acids Res.* *32*, 2008–2016.
19. Schümperli, D., and Pillai, R.S. (2004). The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* *61*, 2560–2570.
20. Goyenvallé, A., Vulin, A., Fougère, F., Leturcq, F., Kaplan, J.C., Garcia, L., and Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* *306*, 1796–1799.
21. Piétri-Rouxel, F., Gentil, C., Vassilopoulos, S., Baas, D., Mousel, E., Ferry, A., Vignaud, A., Hourdè, C., Marty, I., Schaeffer, L., et al. (2010). DHPH alpha1S subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *EMBO J.* *29*, 643–654.
22. Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., et al. (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat. Biotechnol.* *29*, 824–828.
23. Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., Belia, S., Wannenes, F., Nicoletti, C., Del Prete, Z., et al. (2008). Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab.* *8*, 425–436.
24. Boillée, S., Vande Velde, C., and Cleveland, D.W. (2006). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* *52*, 39–59.
25. Talmadge, R.J. (2000). Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve* *23*, 661–679.
26. Peggion, C., Massimino, M.L., Biancotto, G., Angeletti, R., Reggiani, C., Sorgato, M.C., Bertoli, A., and Stella, R. (2017). Absolute quantification of myosin heavy chain isoforms by selected reaction monitoring can underscore skeletal muscle changes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Anal. Bioanal. Chem.* *409*, 2143–2153.
27. Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav.* *3*, 335–350.
28. Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav.* *3*, 431–457.
29. Frazier, K.S. (2015). Antisense oligonucleotide therapies: the promise and the challenges from a toxicologic pathologist's perspective. *Toxicol. Pathol.* *43*, 78–89.
30. Vulin, A., Barthélemy, I., Goyenvallé, A., Thibaud, J.L., Beley, C., Griffith, G., Benchaouir, R., le Hir, M., Unterfinger, Y., Lorain, S., et al. (2012). Muscle function recovery in golden retriever muscular dystrophy after AAV1-U7 exon skipping. *Mol. Ther.* *20*, 2120–2133.
31. Le Guiner, C., Montus, M., Servais, L., Chérel, Y., François, V., Thibaud, J.L., Wary, C., Matot, B., Larcher, T., Guigand, L., et al. (2014). Forelimb treatment in a large cohort of dystrophic dogs supports delivery of a recombinant AAV for exon skipping in Duchenne patients. *Mol. Ther.* *22*, 1923–1935.
32. Mack, D.L., Poulard, K., Goddard, M.A., Latournerie, V., Snyder, J.M., Grange, R.W., Elverman, M.R., Denard, J., Veron, P., Buscara, L., et al. (2017). Systemic AAV8-mediated gene therapy drives whole-body correction of myotubular myopathy in dogs. *Mol. Ther.* *25*, 839–854.
33. Buchlis, G., Podsakoff, G.M., Radu, A., Hawk, S.M., Flake, A.W., Mingozzi, F., and High, K.A. (2012). Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood* *119*, 3038–3041.
34. Nathwani, A.C., Reiss, U.M., Tuddenham, E.G., Rosales, C., Chowdhary, P., McIntosh, J., Della Peruta, M., Lheriteau, E., Patel, N., Raj, D., et al. (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* *371*, 1994–2004.
35. Hudry, E., Martin, C., Gandhi, S., György, B., Scheffer, D.I., Mu, D., Merkel, S.F., Mingozzi, F., Fitzpatrick, Z., Dimant, H., et al. (2016). Exosome-associated AAV vector as a robust and convenient neuroscience tool. *Gene Ther.* *23*, 819.
36. Kishimoto, T.K., Ferrari, J.D., LaMothe, R.A., Kolte, P.N., Griset, A.P., O'Neil, C., Chan, V., Browning, E., Chalishazar, A., Kuhlman, W., et al. (2016). Improving the efficacy and safety of biologic drugs with tolerogenic nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* *11*, 890–899.
37. Chattopadhyay, M., Durazo, A., Sohn, S.H., Strong, C.D., Gralla, E.B., Whitelegge, J.P., and Valentine, J.S. (2008). Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 18663–18668.
38. Ayers, J.I., Fromholt, S.E., O'Neal, V.M., Diamond, J.H., and Borchelt, D.R. (2016). Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta Neuropathol.* *131*, 103–114.
39. Odermatt, P., Trüb, J., Furrer, L., Fricker, R., Marti, A., and Schümperli, D. (2016). Somatic therapy of a mouse SMA model with a U7 snRNA gene correcting SMN2 splicing. *Mol. Ther.* *24*, 1797–1805.
40. Patel, P., Kriz, J., Gravel, M., Soucy, G., Bareil, C., Gravel, C., and Julien, J.P. (2014). Adeno-associated virus-mediated delivery of a recombinant single-chain antibody against misfolded superoxide dismutase for treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Ther.* *22*, 498–510.
41. Saccon, R.A., Bunton-Stasyshyn, R.K., Fisher, E.M., and Fratta, P. (2013). Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain* *136*, 2342–2358.
42. Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr., et al. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* *13*, 43–47.
43. Nedelec, S., Onteniente, B., Peschanski, M., and Martinat, C. (2013). Genetically-modified human pluripotent stem cells: new hopes for the understanding and the treatment of neurological diseases? *Curr. Gene Ther.* *13*, 111–119.
44. Zinman, L., Liu, H.N., Sato, C., Wakutani, Y., Marville, A.F., Moreno, D., Morrison, K.E., Mohlke, K.L., Bilbao, J., Robertson, J., et al. (2009). A mechanism for low penetrance in an ALS family with a novel SOD1 deletion. *Neurology* *72*, 1153–1159.
45. Bosco, D.A., Morfini, G., Karabacak, N.M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B.A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., et al. (2010). Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat. Neurosci.* *13*, 1396–1403.
46. Forsberg, K., Jonsson, P.A., Andersen, P.M., Bergemalm, D., Graffmo, K.S., Hultdin, M., Jacobsson, J., Rosquist, R., Marklund, S.L., and Brännström, T. (2010). Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. *PLoS ONE* *5*, e11552.
47. Da Cruz, S., Bui, A., Saberi, S., Lee, S.K., Stauffer, J., McAlonis-Downes, M., Schulte, D., Pizzo, D.P., Parone, P.A., Cleveland, D.W., et al. (2017). Misfolded SOD1 is not a primary component of sporadic ALS. *Acta Neuropathol.* Published online February 28, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-017-1688-8>.
48. François, V., Klein, A.F., Beley, C., Jollet, A., Lemerrier, C., Garcia, L., and Furling, D. (2011). Selective silencing of mutated mRNAs in DMI by using modified hU7-snRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 85–87.
49. Jiang, J., Zhu, Q., Gendron, T.F., Saberi, S., McAlonis-Downes, M., Seelman, A., Stauffer, J.E., Jafar-Nejad, P., Drenner, K., Schulte, D., et al. (2016). Gain of toxicity from ALS/FTD-linked repeat expansions in C9ORF72 is alleviated by antisense oligonucleotides targeting GGGGCC-containing RNAs. *Neuron* *90*, 535–550.
50. Gurney, M.E. (1994). Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *331*, 1721–1722.
51. Pfohl, S.R., Halicek, M.T., and Mitchell, C.S. (2015). Characterization of the contribution of genetic background and gender to disease progression in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *J. Neuromuscul. Dis.* *2*, 137–150.
52. Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M.Q., and Krainer, A.R. (2003). ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3568–3571.

www.moleculartherapy.org

53. Aartsma-Rus, A., van Vliet, L., Hirschi, M., Janson, A.A., Heemskert, H., de Winter, C.L., de Kimpe, S., van Deutekom, J.C., 't Hoen, P.A., and van Ommen, G.B. (2009). Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol. Ther.* *17*, 548–553.
54. Dominguez, E., Marais, T., Chatauret, N., Benkhalifa-Ziyyat, S., Duque, S., Ravassard, P., Carcenac, R., Astord, S., Pereira de Moura, A., Voit, T., et al. (2011). Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 681–693.
55. Ferry, A., Joanne, P., Hadj-Said, W., Vignaud, A., Lilienbaum, A., Hourdé, C., Medja, F., Noirez, P., Charbonnier, F., Chatonnet, A., et al. (2014). Advances in the understanding of skeletal muscle weakness in murine models of diseases affecting nerve-evoked muscle activity, motor neurons, synapses and myofibers. *Neuromuscul. Disord.* *24*, 960–972.
56. Scott, S., Kranz, J.E., Cole, J., Lincecum, J.M., Thompson, K., Kelly, N., Bostrom, A., Theodoss, J., Al-Nakhala, B.M., Vieira, F.G., et al. (2008). Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler.* *9*, 4–15.