



**HAL**  
open science

# Détermination du rôle des neurones corticospinaux dans le déclenchement et la progression de la sclérose latérale amyotrophique chez les souris Sod1G86R

Thibaut Burg

► **To cite this version:**

Thibaut Burg. Détermination du rôle des neurones corticospinaux dans le déclenchement et la progression de la sclérose latérale amyotrophique chez les souris Sod1G86R. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ046 . tel-02539135

**HAL Id: tel-02539135**

**<https://theses.hal.science/tel-02539135>**

Submitted on 9 Apr 2020

**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 DE STRASBOURG

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

UMR-S INSERM 1118

**THÈSE** présentée par :

**Thibaut BURG**

soutenue le : **06 septembre 2019**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Détermination du rôle des neurones  
corticospinaux dans le déclenchement  
et la progression de la sclérose latérale  
amyotrophique chez les souris Sod1<sup>G86R</sup>**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme ROUAUX Caroline**

CR, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme MARCHAND-PAUVERT Véronique**

DR, Université Paris VI

**Mr BRANCHEREAUX Pascal**

PR, Université de Bordeaux

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mr VEINANTE Pierre**

PR, Université de Strasbourg

**Mr ECHANIZ-LAGUNA Andoni**

PU-PH, Hôpitaux de Paris

La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations  
de notre imagination et que les illusions de notre ignorance  
Claude Bernard (1813-1878)

# Remerciements

La thèse est une aventure scientifique haletante et passionnante mais aussi et surtout une aventure humaine. Erwin CHAGRAFF disait que « dans les sciences, le chemin est plus important que le but. Les sciences n'ont pas de fin ». Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à cette thèse.

En premier, je souhaite remercier très chaleureusement ma directrice de thèse, **Caroline ROUAUX**. Merci de m'avoir accordé ta confiance durant ces 4 années et de m'avoir confié ce magnifique projet. J'en ressors grandi grâce à toi, tes encouragements, tes nombreux conseils, ta méthodologie, ta rigueur et aussi ta bonne humeur. Tu as su créer les meilleures conditions pour réaliser à bien cette thèse.

Je remercie **Jean-Philippe LOEFFLER**, directeur du laboratoire quand je suis arrivé en master, de m'avoir laissé l'opportunité de rejoindre l'unité de recherche. Je remercie également **Luc DUPUIS**, directeur actuel du laboratoire, pour m'avoir toujours soutenu dans mes actions et pour tes réflexions toujours instructives.

Je souhaiterais remercier les membres du jury, **Véronique MARCHAND-PAUVERT**, **Pascal BRANCHEREAU**, **Pierre VEINANTE** et **Andoni ECHANIZ-LAGUNA** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail de thèse.

Sans chacune des personnes du laboratoire **U1118**, cette thèse n'aurait pas abouti. Alors merci tout le monde, notre cohésion fut une force importante pour tenir lors de cette thèse. Un grand merci à **Brigitte** pour m'avoir aidé à me défaire de la complexité des tâches administratives. Merci à **Annie, Sylvie, Marie-Jo, Claudia** et **Jérôme**, vous m'avez simplifié mon quotidien. **Raph**, joyeuses Pâques et merci pour ta joie quotidienne. Merci à **Alex, Marc, José, Fred**, pour toutes vos remarques pertinentes qui ont apporté leur pierre à l'édifice. **Christine**, présente depuis les débuts pour me transmettre les bonnes pratiques mais aussi les mauvaises blagues à faire. My dear **Jelena**, on se souviendra longtemps de nos journées devant l'EMG, le fessier endolori. Merci pour tout ce que tu as fait. **Mathieu**, il y aurait tellement à dire, dü besch den bescht, mein Schotz. **Geoffrey**, ton aide fut précieuse en fin de course. Dédicace à **Marco** et **Max**, les LP. **Stéphane**, compagnon endiablé de bureau et de cage (le Spiel !). **Gina**, tu pourrais écrire un livre sur tous mes déboires durant la thèse, merci d'avoir été là. Je rajoute que je suis 100% alsacien. **Robin**, qu'est-ce qu'on a rigolé (ITA). Pour



faire écho à ta thèse, quand tu veux je te donne une leçon au caps ou à chifoumi. **Aurore**, tu endosses maintenant le poids des responsabilités. **Cyril** et **Alex**, à deux pour plus de folie, surtout le soir tard au labo. **Imma**, n'oublie jamais que la lecture de la bible n'a que peu d'effets sur un scientifique, même s'il porte une kippa en aluminium faite maison. Vielen Danke für alles meine Liebe Koalito.

Je tiens à remercier mes collaborateurs, **François LEFEBVRE**, **Matilde CORDERO-ERAUSQUIN** et **Charlotte BICHARA**, qui m'ont chacun apporté leur expertise. Une mention pour Charlotte et sa pugnacité, un mot à la hauteur de l'énergie que tu as mise pour m'aider.

**Doctoneuro**, une aventure associative enrichissante. Un grand merci au bureau fondateur, **Max**, **Léa**, **Baptiste**, **Clarisse**, **Emeline**, **David**, **Perrine** et **Lucas**, et aux bureaux suivants et toutes les personnes qui m'ont aidé au service de la pédagogie. Je dédie la réussite de la coloration de ma barbe et du traitement d'image à **Charlène** !

Enfin, j'adresse mon plus grand remerciement pour mon pilier le plus solide, la famille. Tout d'abord mes frères et sœurs d'une autre mère, vous étiez mon sucre dans mes moments d'hypoglycémie, mes molécules de sérotonine. **Ludo**, depuis la L1 tu es mon partenaire de science, mon ami. Ma réussite est aussi la tienne. **Lucas**, mon soldat sûr, mon bâton et mon berger dans les montagnes macédoniennes. **Marjo**, une personne en or, ta sagesse et ta bonté m'ont été précieuses. **Elaine**, ma semblable, le réconfort de ta laine de lama m'a toujours fait un bien fou. Mon frère de toujours, **Yann** tu es celui qui a tout vu depuis la maternelle, toujours là pour me faire la passe dans la raquette. Tu as toujours compté, avec mon frère exilé **Zack**, toujours avare d'anecdotes scientifiques. **Louise**, ma sœur de sang, tes encouragements m'ont beaucoup aidé, merci à toi, mais aussi à **Vic**. Grâce à vous avant d'être docteur, je suis un Lord. **Maman**, mon soutien infailible, ma force la plus puissante. Mes voyages dans les Vosges furent de véritables bouffées d'oxygène indispensables. **Papa**, ton soutien et ton aide dans la dernière ligne droite a été précieuse, en plus de ta culture de la gagne. **Mamie et Papi**, toujours là pour me donner des forces et s'assurer que je mange à ma faim ! Merci à tout le reste de ma famille pour votre soutien continu, **Danielle**, **Jean-Marie**, **Julie**, **Ophélie**, **Yann**, **Dalanda**, **Jean-Baptiste**, **Pierre**, **Isabelle** et **Jacques**. Du fond du cœur, je vous remercie pour tout. Une dernière pour ma petite **Mamie**, partie avant la fin de ce magnifique projet, toi qui en as vu les prémices, j'espère que de là-haut tu es fière de moi.

# Table des matières

<b>Abréviations.....</b>	<b>8</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>CHAPITRE I : Le système moteur .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Organisation anatomo-fonctionnelle .....</b>	<b>12</b>
<b>2. L'unité motrice.....</b>	<b>14</b>
2.1 Contraction musculaire .....	14
2.2 Les différents types d'unité motrice .....	15
2.3 Contrôle des unités motrices .....	16
<b>3. Contrôle cortical de l'unité motrice.....</b>	<b>18</b>
3.1 Les aires corticales motrices.....	18
3.2 Organisation fonctionnelle du cortex moteur.....	19
3.3 Organisation cytoarchitecturale du cortex moteur.....	21
3.4 Voie pyramidale .....	23
<b>4. Contrôle sous-cortical de l'unité motrice.....</b>	<b>26</b>
4.1 Les noyaux vestibulaires.....	26
4.2 La formation réticulée.....	26
4.3 Les collicules supérieurs .....	27
4.4 Le noyau rouge.....	27
4.5 Les voies extrapyramidales .....	28
<b>5. Différences entre le système moteur de l'Homme et des rongeurs .....</b>	<b>31</b>
5.1 Anatomie et physiologie comparative .....	31
5.2 Effets différentiels des lésions.....	33
<b>6. Maladies du système moteur.....</b>	<b>35</b>
6.1 Maladies affectant les neurones corticospinaux.....	36
6.2 Maladies affectant les motoneurones .....	37
6.3 Sclérose Latérale Amyotrophique .....	38
<b>CHAPITRE II : La sclérose latérale amyotrophique.....</b>	<b>39</b>
<b>1. Aspects cliniques.....</b>	<b>39</b>
1.1 Historique et définitions.....	39
1.2 Épidémiologie.....	39
1.3 Étiologie.....	41
1.4 Hétérogénéité des signes cliniques.....	49
1.5 Diagnostic et méthodes d'évaluation.....	53

<b>2. Modélisation de la SLA .....</b>	<b>55</b>
2.1 Modèles murins <i>Sod1</i> .....	55
2.2 Autres modèles murins .....	59
2.3 Modèles cellulaires.....	61
<b>3. Mécanismes physiopathologiques .....</b>	<b>63</b>
3.1 Dégénérescence des neurones moteurs.....	64
3.2 Atteintes d'autres types cellulaires.....	71
<b>4. Traitements et approches thérapeutiques.....</b>	<b>76</b>
4.1 Médicaments autorisés.....	76
4.2 Traitements symptomatiques .....	77
4.3 Approches thérapeutiques alternatives.....	79
<b>CHAPITRE III : Cortex cérébral et sclérose latérale amyotrophique .....</b>	<b>82</b>
<b>1. Place du cortex dans la recherche sur la SLA.....</b>	<b>82</b>
<b>2. Dysfonctionnements corticaux.....</b>	<b>83</b>
2.1 Chez les patients SLA.....	83
2.2 Chez la souris.....	86
2.3 Hyperexcitabilité corticale.....	87
<b>3. Dégénérescence et altérations des NCS.....</b>	<b>89</b>
3.1 Chez les patients SLA.....	89
3.2 Chez la souris.....	91
<b>4. Syndrome pyramidal et spasticité .....</b>	<b>93</b>
4.1 Pathophysiologie de la spasticité .....	94
4.2 Traitement de la spasticité .....	98
4.3 Diagnostic de la spasticité .....	99
4.4 Spasticité et SLA .....	101
<b>5. Initiation et propagation de la SLA : le débat .....</b>	<b>103</b>
5.1 Hypothèse d'une dégénérescence indépendante.....	104
5.2 Hypothèse d'une propagation rétrograde .....	105
5.3 Hypothèse d'une propagation antérograde.....	106
<b>6. Arguments en faveur d'une origine corticale et d'une propagation corticofuge .....</b>	<b>106</b>
6.1 Arguments génétiques .....	106
6.2 Arguments cliniques.....	107
6.3 Arguments pathophysiologiques .....	110
6.4 Arguments électrophysiologiques.....	111
6.5 Arguments précliniques .....	112
<b>7. Comment tester la contribution du cortex chez la souris ? .....</b>	<b>113</b>
7.1 Le facteur de transcription <i>Fezf2</i> .....	113
7.2 Les souris <i>Fezf2</i> KO .....	115

<b>Problématique et objectifs de thèse.....</b>	<b>118</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>121</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>161</b>
<b>1. Pertinence des souris <i>Sod1<sup>G86R</sup></i> dans le contexte de l'étude des NCS .....</b>	<b>162</b>
1.1 Les souris <i>Sod1<sup>G86R</sup></i> récapitulent la perte des NCS et des MN ainsi que les principaux symptômes associés à la SLA .....	162
1.2 Les NCS dégénèrent de manière précoce, spatio-temporelle et somatotopique chez les souris <i>Sod1<sup>G86R</sup></i> .....	163
<b>2. Génération d'un modèle murin développant la SLA en l'absence de NPSC .....</b>	<b>165</b>
2.1 L'absence de NPSC induit des effets bénéfiques sur le déclenchement et la progression de la SLA 167	
2.2 L'absence de NPSC réduit la perte de poids au cours de la maladie.....	169
2.3 L'absence de NPSC n'empêche pas le développement de la maladie .....	170
2.4 L'établissement de la spasticité ne dépend pas de la dégénérescence des NCS .....	171
<b>3. Mécanismes physiopathologiques de la toxicité des NCS.....</b>	<b>175</b>
3.1 Dissémination de protéines mal repliée et d'agrégats toxiques.....	176
3.2 Excitotoxicité glutamatergique .....	176
3.3 Propagation d'un message toxique via le noyau rouge .....	177
<b>4. Limites du modèle <i>Fezf2<sup>-/-</sup> / Sod1<sup>G86R</sup></i>.....</b>	<b>178</b>
4.1 Compensations du système moteur murin .....	178
4.2 Compensations inhérentes à la perte d'expression de <i>Fezf2</i> .....	181
4.3 Comment outrepasser ces compensations ? .....	182
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>183</b>
<b>BILIOGRAPHIE .....</b>	<b>186</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>242</b>

## Table des illustrations et tableaux

Figure 1 : Organisation des structures impliquées dans le contrôle des mouvements. ....	13
Figure 2 : Les différents types d'unités motrices et de motoneurones. ....	14
Figure 3 : Contrôle supérieur des unités motrices. ....	17
Figure 4 : Les aires motrices corticales.....	19
Figure 5 : Représentation cytoarchitecturale du cortex moteur. ....	23
Figure 6 : La voie descendante pyramidale.....	24

Figure 7 : Les voies descendantes extrapyramidales. ....	30
Tableau 1 : Comparaison des systèmes moteurs de l'Homme et des rongeurs (rat et souris). ....	33
Figure 8 : Exemples de maladies du système moteur. ....	35
Figure 9 : Les signes cliniques de la dégénérescence des NCS et des MN. ....	38
Figure 10 : Découverte des gènes associés à la SLA et implications physiopathologiques. ....	42
Tableau 2 : Principaux gènes découverts associés à la SLA. ....	45
Figure 11 : Le modèle Gène-Temps-Environnement (GTE). ....	48
Figure 12 : Les différents sites d'apparition de la SLA. ....	50
Tableau 3 : Le diagnostic de la SLA selon les critères d'El Escorial et ses révisions. ....	52
Tableau 4 : Principaux modèles murins SOD1. ....	56
Figure 13 : Le modèle murin Sod1G86R récapitule la perte des neurones corticospinaux (NCS) et des motoneurones (MN). ....	58
Figure 14 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA. ....	64
Figure 15 : Les neurones corticospinaux sont peu représentés dans les études précliniques. ....	82
Figure 16 : Atteintes des centres supraspinaux chez les patients SLA. ....	85
Figure 17 : L'hyperexcitabilité corticale dans la SLA. ....	88
Figure 18 : Atteintes histopathologiques des neurones corticospinaux chez les patients SLA. ....	90
Figure 19 : Influences spinales sur l'excitabilité des motoneurones. ....	95
Figure 20 : Influences supraspinales sur les réflexes de la moelle épinière. ....	96
Figure 21 : Le réflexe d'Hoffmann. ....	100
Figure 22 : Hypothèses de l'origine et de la propagation de la SLA. ....	103
Figure 23 : Le continuum entre la SLA et la démence fronto-temporale. ....	107
Figure 24 : Influences du type de connexion synaptique entre les neurones corticospinaux et les motoneurones sur les symptômes SLA. ....	108
Figure 25 : Hypothèse d'une propagation séquentielle corticofuge de la pathologie TDP-43. ....	110
Figure 26 : Le facteur de transcription Fezf2 permet la genèse des neurones à projections subcérébrales. ....	114
Figure 27 : Les souris Fezf2 KO n'ont pas de neurones corticospinaux ni de connexion à la moelle épinière. ....	116
Figure 28 : Problématique et objectifs de thèse. ....	120

# Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique  
ALSFRS : amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale  
ALS2 : alsin rho guanine nucleotide exchange factor  
AMS : aire motrice supplémentaire  
ARN : acide ribonucléique  
ATP : adénosine triphosphate  
CHCHD10 : coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain 10  
CHMP2B : Charged multivesicular body protein 2B  
CSNa : cellule souche neurale adulte  
CSPi : cellule souche pluripotente induite  
C9ORF72 : chromosome 9 open reading frame 72  
DFT : démence frontotemporale  
DKK1 : Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor  
DNCT1 : dynactine 1  
EH1 : Engrailed homology 1  
EMG : électromyographie  
EPHA4 : ephrin A4  
Fezf2 : Forbrain embryonic zinc finger 2  
FUS : fused in sarcoma  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GAD1 : glutamate décarboxylase 1  
HNRNPA1 : heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1  
IMC : indice de masse corporelle  
IRM : imagerie par résonance magnétique  
JNM : jonction neuromusculaire  
KAP3 : kinesin associated protein 3  
KCC2 : transporteur potassium-chlorure 2  
KI : knock-in  
KIF5A : kinesin family member 5A

KO : knock-out  
M1 : cortex moteur primaire  
M2 : cortex prémoteur  
MN : motoneurone  
NCS : neurone corticospinal  
NPSC : neurone à projections subcérébrales  
NR : noyau rouge  
OAS : oligonucléotides antisens  
OPTN : optineurine  
PFN1 : profilin 1  
RE : réticulum endoplasmique  
SETX : senataxine  
SICI : inhibition corticale à courte latence  
SLA : sclérose latérale amyotrophique  
SMN1 : survival of motor neuron 1  
SMT : stimulation transcrânienne  
SOD1 : superoxide dismutase 1  
TBK1 : TANK binding kinase 1  
TCS : tractus corticospinal  
TDP-43 : TAR DNA binding protein 43  
TUB4A : tubuline alpha 4A  
Type FF : type fast-fatigable  
Type FR : type fast-resistant  
Type S : type slow  
UBQLN2 : ubiquitine 2  
UCHL1 : ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1  
UM : unité motrice  
VAPB : VAMP associated protein B  
VCP : vasolin containing protein  
VGLUT1 : transporteur vésiculaire du glutamate 1  
ZSV : zone sous-ventriculaire

# Avant-propos

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative rare et incurable. La perte conjointe et sélective des neurones corticospinaux (NCS) et des motoneurones (MN) entraîne une paralysie progressive conduisant à la mort entre 2 et 5 ans après le diagnostic initial. La compréhension de l'étiologie et de la physiopathologie est une étape importante permettant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ce manuscrit débutera par une introduction décrivant d'abord le système moteur lors de son fonctionnement physiologique, chez l'Homme. Une comparaison avec le système murin sera faite pour mieux comprendre l'interprétation des résultats. La seconde partie de l'introduction sera consacrée à la SLA, allant des observations cliniques aux dernières recherches précliniques. Enfin, la dernière partie fera le lien entre le cortex, les NCS et la SLA. Dans la partie résultats, je présenterai la publication scientifique découlant de mes travaux de thèse, qui sera suivi d'une courte partie me permettant de discuter des résultats.

Durant ma thèse, j'ai également travaillé sur un autre projet ayant pour objectif de tester la faisabilité d'une première stratégie thérapeutique basée sur la génération de NCS, à partir des cellules souches neurales adultes (CSNa) du cerveau de souris modélisant la SLA. Mes travaux de master ont permis de mettre en évidence que les CSNa ne sont pas affectées par la SLA dans le modèles murin *Sod1<sup>G86R</sup>* et qu'elles demeurent fonctionnelles et donc potentiellement utilisables à des fins thérapeutiques. J'ai ensuite tenté de mettre au point un protocole de différenciation dirigée des CSNa en NCS. Cependant, malgré d'intenses efforts, il semble que la technique employée ne m'a pas permise de cibler les cellules d'intérêt (en dépit de plusieurs publications scientifiques précédentes). Depuis, ma collègue Aurore Brunet tente de développer une technique alternative. Mes travaux initiaux, présentés dans mon rapport de stage de master ont été mis annexe et ne seront pas discutés.

J'ai également inclus en annexe deux publications scientifiques auxquelles j'ai contribué durant ma thèse. Le premier traite de l'effet de l'âge sur une tâche mnésique, le second traite les NCS dans la SLA et pose les bases de mes travaux de thèse, il sera donc commenté dans la discussion.



# INTRODUCTION

# CHAPITRE I : Le système moteur

Mes travaux de thèse se basent sur l'étude d'un modèle murin de la sclérose latérale amyotrophique. Néanmoins, il est important de considérer le système moteur humain pour mettre en perspective ses différences avec le système murin. Ainsi, je consacre ce premier chapitre à la description du système moteur humain, complété par des études chez les primates non humains, lorsque les résultats sont manquants chez l'Homme.

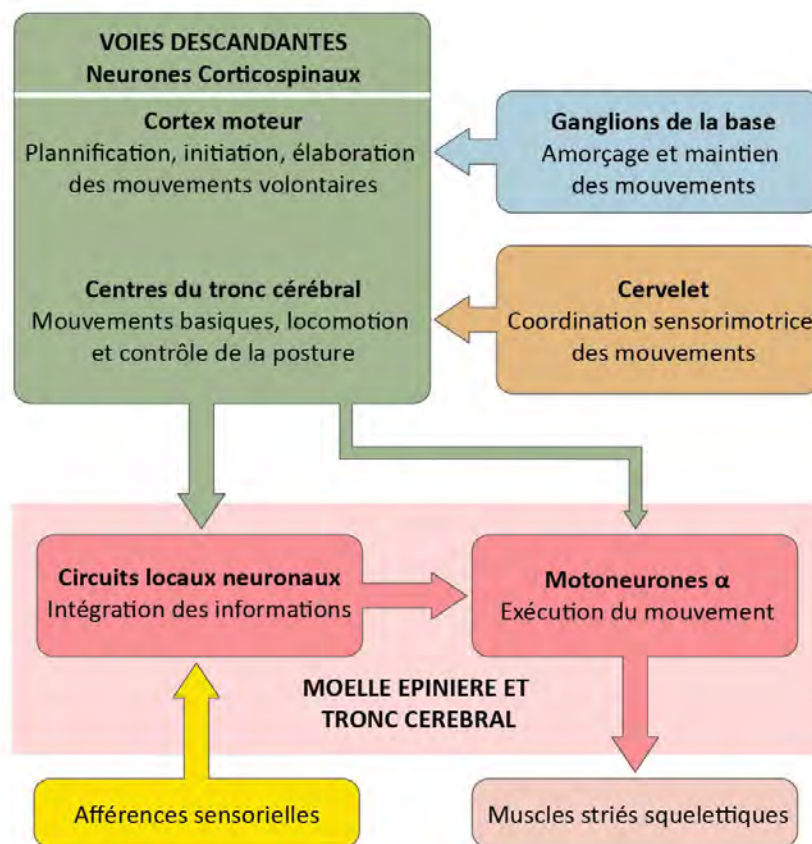
## 1. Organisation anatomo-fonctionnelle

Le corps humain est composé d'environ 640 muscles striés squelettiques, tous sous le contrôle du système nerveux central. Cela donne à l'Homme la capacité de produire un immense répertoire de mouvements et de réponses comportementales. Il existe trois types de motricité : 1) La motricité volontaire permet d'agir consciemment sur les muscles squelettiques grâce à un contrôle cortical des unités motrices (UM), en synergie avec les fonctions sensorielles. 2) La motricité automatique est hors du champ de la conscience, elle implique les structures sous corticales présentes dans le tronc cérébral notamment. Elle est utile pour la locomotion et le maintien postural. 3) Les réflexes assurent une réponse rapide et inconsciente face à des stimuli internes ou externes et mettent uniquement en jeu les réseaux neuronaux de la moelle épinière.

Les mouvements volontaires sont organisés en trois phases qui vont chacune impliquer différentes structures du système moteur, elles doivent répondre à trois questions : 1) Que faire ? La première phase identifie le but et permet la préparation du mouvement en sélectionnant une réponse adaptée à la situation parmi un répertoire de réponses possibles. Cette phase met en jeu les aires associatives préfrontales et le système limbique. 2) Comment faire ? La deuxième phase planifie le mouvement. Elle définit l'enchaînement de séquences de contractions musculaires nécessaires pour la réalisation du mouvement. Le cortex moteur encode les données spatiales et temporelles du mouvement grâce aux informations sensorielles obtenues. Il coordonne les membres, la direction du regard et l'orientation du corps. Les noyaux gris centraux jouent également un rôle important dans cette phase. 3) Je fais, mais ai-je bien fait ? La troisième phase est la réalisation de la tâche motrice. Elle met en jeu le cortex moteur qui contient notamment les Neurones Corticospinaux (NCS) qui

projetent directement ou indirectement vers les Motoneurones Bulbaires et Spinaux (MN). Grâce à leur activation, les MN permettent la contraction musculaire. Durant cette phase, le mouvement est contrôlé et ajusté en permanence par le cervelet et les noyaux gris centraux.

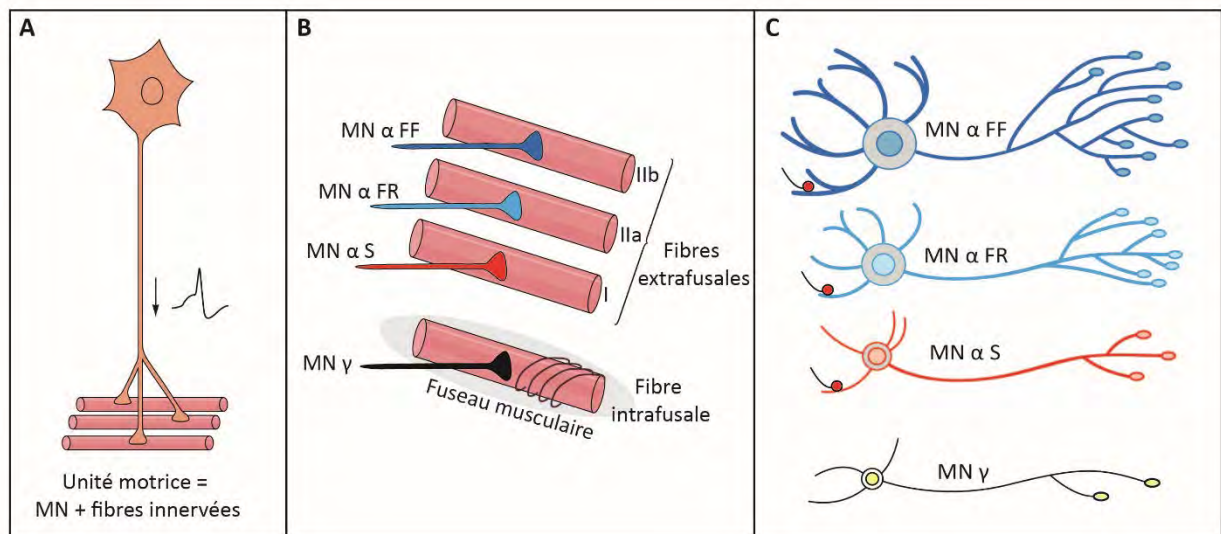
Cette vision très hiérarchisée du système moteur où la commande motrice est faite en série n'est pas strictement réaliste. Le système est bien plus complexe et ultra-connecté, avec de nombreuses boucles de communication entre les différents niveaux et des actions réalisées en parallèle (Graziano, 2006; Rizzolatti et al., 1998) (Figure 1).



**Figure 1 : Organisation des structures impliquées dans le contrôle des mouvements.** La génération des mouvements nécessite la coordination de l'ensemble des composants du système moteur. Les voies descendantes, qui sont modulées par le cervelet et les ganglions de la base, contrôlent l'activité des neurones et motoneurones du tronc cérébral et de la moelle épinière. Ces derniers vont innerver les muscles striés squelettiques et permettent leur contraction afin d'exécuter le mouvement. (Adaptation de (Purves et al., 2014)).

## 2. L'unité motrice

L'unité motrice (UM) est le plus petit élément contractile du mouvement, c'est l'unité fonctionnelle basique du système moteur qui permet la contraction musculaire. Elle est composée d'un motoneurone (MN) et de l'ensemble des fibres musculaires innervées par l'axone de ce dernier (Figure 2). L'UM est un transducteur neuromécanique puisqu'elle reçoit des informations neuronales sensorielles et motrices qu'elle transforme en force mécanique pour générer le mouvement (Duchateau and Enoka, 2011; Heckman and Enoka, 2012).



**Figure 2 : Les différents types d'unités motrices et de motoneurones. A)** L'unité motrice (UM) comprend un motoneurone (MN) et l'ensemble des fibres qu'il innerve. **B)** Il existe plusieurs types d'UM parmi les muscles striés squelettiques. Les MN $\alpha$  innervent les fibres intrafusales et se divisent en 3 catégories : les MN $\alpha$  FF (fast fatigable) innervent les fibres IIb, les MN $\alpha$  FR (fast resistant) innervent les fibres IIa, MN $\alpha$  S (slow) innervent les fibres I. Les MN $\gamma$  innervent les fibres extrafusales qui sont aussi innervées par les MN $\beta$  (non montré). **C)** La taille et la complexité morphologique diminuent progressivement chez les MN $\alpha$  FF, FR, S et enfin les MN $\gamma$ . (Adaptation de (Kanning et al., 2010)).

### 2.1 Contraction musculaire

Un muscle est contrôlé généralement par une centaine d'UM, mais ce nombre peut varier en fonction du type de muscle. Les corps cellulaires des MN sont situés dans la corne ventrale de la moelle épinière sous forme de cluster et dans les noyaux moteurs du tronc

cérébral. Les axones des MN quittent la moelle épinière par la racine ventrale ou par un nerf crânien au niveau du tronc cérébral pour aller contacter un muscle et permettre la contraction musculaire (Heckman and Enoka, 2012). Les MN sont des neurones cholinergiques, leur dépolarisation entraîne la génération d'un potentiel d'action qui permet le relargage d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire (JMN), qui est une synapse spécialisée entre le MN et la fibre musculaire (Wood and R. Slater, 2001). Les neurotransmetteurs se lient à leurs récepteurs nicotiques couplés à des canaux sodiques (Flucher and Daniels, 1989) et entraînent un influx ionique qui permet à la membrane musculaire de se dépolariser, l'augmentation du calcium intracellulaire permet ensuite la contraction musculaire (Wood and R. Slater, 2001).

Il existe trois grands types de MN qui innervent des types de fibres musculaires distinctes (Figure 2). Les  $MN\gamma$  innervent des fibres intrafusales, situées au sein du fuseau neuromusculaire. Ce sont des fibres spécialisées qui ont un rôle sensoriel de mécanorécepteur. Ces  $MN\gamma$  régulent l'information sensorielle en modifiant la longueur des fibres pour ajuster la contraction musculaire. Les  $MN\alpha$  innervent les fibres extrafusales, striées, qui sont responsables de la contraction musculaire lors du mouvement. Ce sont ces  $MN\alpha$  et leurs fibres extrafusales qui constituent l'unité motrice. Les  $MN\beta$  sont une population moins bien définie puisqu'ils innervent à la fois les fibres intrafusales et extrafusales. Chez les vertébrés ayant un système mature, une fibre musculaire est contactée par un MN. En revanche, un MN peut contacter plusieurs fibres musculaires. Le nombre de fibres innervées peut varier de quelques-unes à plusieurs centaines en fonction du type de muscles dans lequel on se situe. De plus, ce nombre peut également varier au sein même d'un muscle (Heckman and Enoka, 2012; Kanning et al., 2010).

## **2.2 Les différents types d'unité motrice**

Trois types d'UM ont été identifiées. Les muscles sont des structures hétérogènes qui présentent une mosaïque de fibres avec des propriétés morphologiques, histochimiques et électrophysiologiques différentes (Heckman and Enoka, 2012) (Figure 2).

Pour identifier les différents types d'UM, plusieurs critères sont à observer comme la taille des MN, le nombre et le type de fibres musculaires innervées, la vitesse et la force. Les MN ayant un petit soma innervent peu de fibres musculaires, ainsi l'UM génère peu de force.

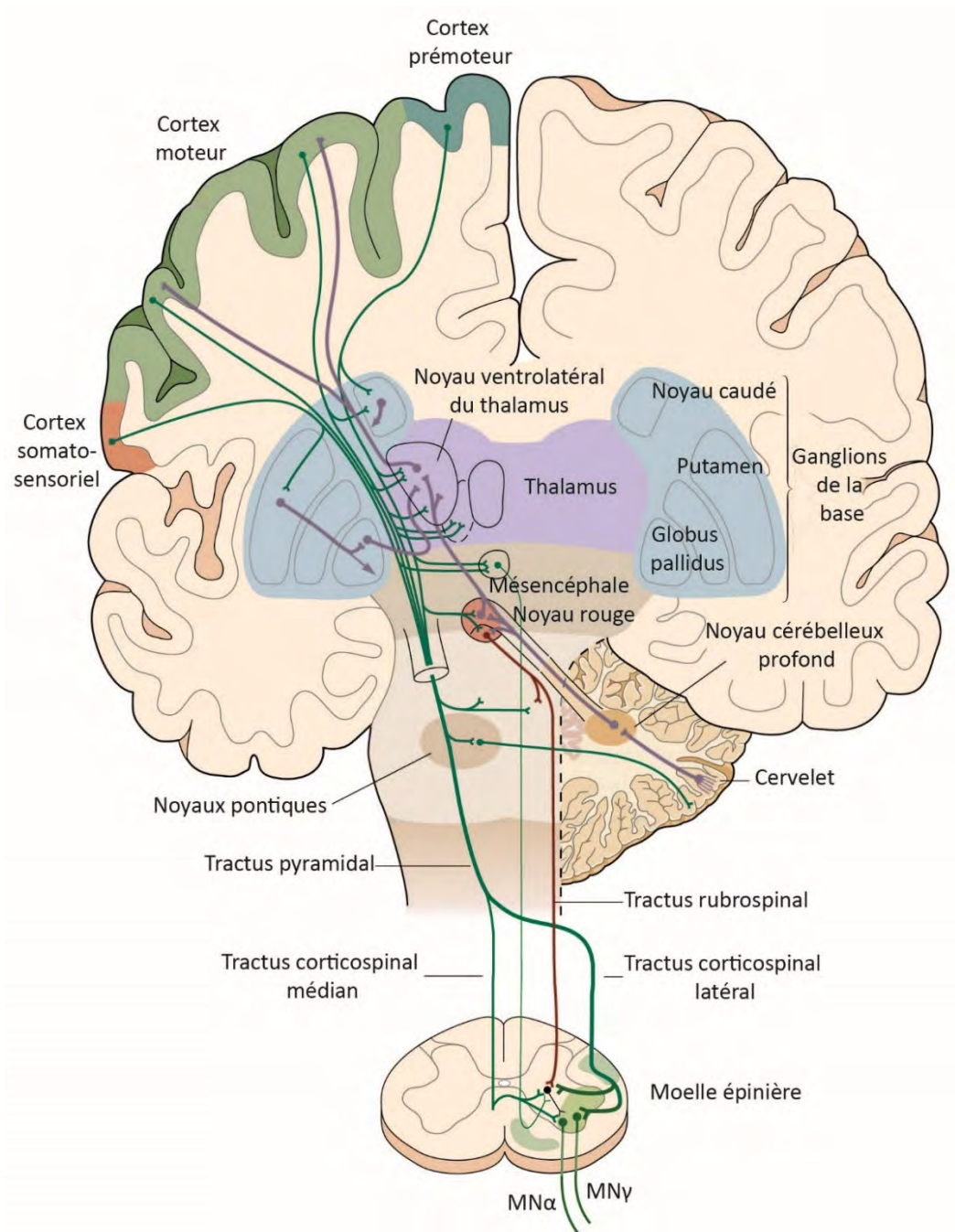
Les MN ayant un grand soma innervent plus de fibres et engendrent donc une force plus importante. Les UM de type S (slow) sont de petites UM qui ont des fibres musculaires de petites tailles et de couleur rouge. Ces fibres se contractent lentement en générant de petites forces. Elles possèdent beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires. Ces caractéristiques leurs permettent de résister à la fatigue. Les UM de type FF (fast fatigable) sont de grandes UM possédant de larges fibres de couleur pâle qui génèrent une plus grande force. Cependant ces fibres ont peu de mitochondries et sont donc sensibles à la fatigue. Les UM de type FR (fast resistant) se situent entre les deux précédents types. De taille intermédiaire, ce type n'est pas aussi rapide que les fibres de type FF mais génère plus de force que les fibres de type S. Ce type est également résistant à la fatigue.

Dans un muscle, on retrouve les trois types d'UM. Selon le type de muscle, le ratio de type de fibre va changer. Par exemple, les muscles nécessitant une contraction maintenue comme les muscles posturaux sont enrichis en fibres de type S. Les muscles nécessitant une contraction rapide avec une grande force sont enrichis en fibres de type FF. La diversité des UM répond donc à un besoin fonctionnel (Heckman and Enoka, 2012; Kanning et al., 2010).

### **2.3 Contrôle des unités motrices**

La régulation de la force développée par les muscles dépend du nombre d'UM activées à un temps donné. Plus la force musculaire augmente, plus le nombre d'UM recrutées est important. Les UM de type S sont recrutées les premières car elles ont un seuil d'activation bas. Ensuite, ce sont les UM de type FR puis les types FF qui sont recrutées à leur tour. C'est le principe de taille (Desmedt, 1983).

Les MN de la moelle épinière et du tronc cérébral se situent dans des circuits locaux d'interneurones très fortement intégrés, permettant la coordination de l'activité des différents groupes musculaires. Ils sont responsables de la genèse de schémas basiques activant les muscles lors de la locomotion ou de mouvements stéréotypés (Catela et al., 2015; Goulding, 2009). Dans la moelle épinière, les circuits locaux sont les premiers intégrateurs de l'information sensorielle, transmise par les neurones propriocepteurs qui informent de l'état contractile et de la position du muscle. Ces informations sont utiles pour la perception du mouvement mais aussi pour les ajustements nécessaires de la trajectoire, de la vitesse et de la force. Dans ce sens, les informations sensorielles sont ensuite transmises aux centres supérieurs du cerveau et du tronc cérébral (Catela et al., 2015; Dasen, 2009).



**Figure 3 : Contrôle supérieur des unités motrices.** Le système moteur est hautement organisé et connecté. Les aires corticales impliquées projettent vers les régions sous corticales comme le thalamus, les ganglions de la base, le cervelet et les noyaux moteurs du tronc cérébral (en vert). Les fibres issues du cortex forment le tractus pyramidal et vont innover les motoneurones (MN) de la moelle épinière de façon directe ou indirecte en passant par un interneurone. D'autres fibres provenant des noyaux moteurs vont également aller innover ces neurones spinaux. Des projections locales permettent de connecter les différentes régions entre elles (en violet). (Adaptation de (Kandel et al., 2012)).

Les UM et leurs réseaux locaux sont contrôlés par les centres supérieurs qui sont situés dans le cerveau et le tronc cérébral (Figure 3). Des neurones envoient de longues projections qui sont regroupées dans les différents tractus de la moelle épinière. On distingue deux grandes voies : la voie pyramidale et la voie extrapyramidale. Ce terme renvoie à la description anatomique des pyramides bulbaires, lieu de passage de la voie pyramidale. Cette voie pyramidale contient les axones des neurones projetant depuis le cortex vers la moelle épinière. Au contraire, la voie extrapyramidale contient les axones des neurones projetant depuis les centres moteurs du tronc cérébral, le noyau rouge, la formation réticulée, les noyaux vestibulaires et les collicules supérieurs (Lawrence and Kuypers, 1968a, b; Lemon, 2008).

### **3. Contrôle cortical de l'unité motrice**

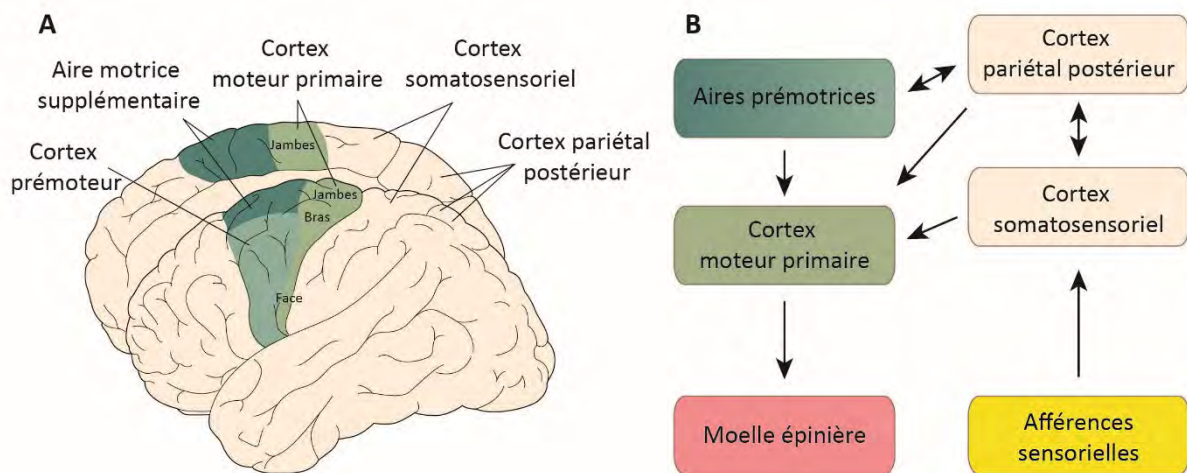
Chez l'Homme, le cortex cérébral moteur est situé au sein du lobe frontal, dans sa partie postérieure, en avant du sillon central. (Taylor and Gross, 2003).

#### **3.1 Les aires corticales motrices**

Pour réaliser les différentes tâches de l'acte moteur, plusieurs aires corticales sont impliquées et sont toutes très fortement interconnectées (Figure 4). Le cortex moteur comprend le cortex moteur primaire (M1) ainsi que 6 aires prémotrices regroupées sous le nom de cortex prémoteur. D'un point de vue anatomique, M1 correspond à l'aire 4 de Brodmann située au niveau du gyrus précentral (Brodmann, 1909; Fulton, 1935), identifiée par la présence de cellules pyramidales géantes dans la couche V, les cellules de Betz (Betz, 1874). La désignation des aires motrices fait l'objet plusieurs controverses. Initialement, le terme prémoteur désigne l'aire 6 de Brodmann, localisée tout juste antérieure à M1 (Brodmann, 1909; Fulton, 1935). Mais ce découpage cytoarchitectural ne corrobore pas avec ses fonctions très hétérogènes. Les aires prémotrices sont donc identifiées en fonction de leurs connexions et notamment vers M1. On peut ainsi décrire 6 régions : l'aire prémotrice dorsale, l'aire prémotrice ventrale, l'aire motrice supplémentaire (AMS) et les aires motrices cingulaires dorsale, ventrale et rostrale (Geyer et al., 1996; Halsband et al., 1993; Rizzolatti et al., 1996; Roland, 1984; Roland et al., 1980a; Roland et al., 1980b; von Cramon and Jurgens, 1983) (Figure 4).



D'autres aires non motrices participent à l'élaboration et à l'exécution du mouvement de manière indirecte, en projetant vers les aires motrices. M1 et les aires prémotrices reçoivent des efférences des lobes frontaux et pariétaux. Ce sont notamment des informations des cortex somatosensoriels primaire et secondaire, situés en arrière du sillon central (Roland, 1984). Ces connections participent à l'intégration multimodale somatosensorielle, l'attention spatiale et le contrôle visuomoteur (Andersen and Cui, 2009). Le cortex limbique est également impliqué dans tous les aspects émotifs et affectifs du mouvement. Plus précisément, c'est le cortex insulaire granulaire qui est mis en jeu. On note également la participation du cortex préfrontal pour tous les aspects cognitifs et les fonctions exécutives (Oxbury, 1970; Roland, 1985; Teuber, 1972).



**Figure 4 : Les aires motrices corticales. A)** Les aires corticales impliquées dans la motricité volontaire se trouvent en avant du sillon central et représentent les aires 4 et 6 de Brodmann. On y retrouve le cortex moteur primaire, l'aire motrice supplémentaire et le cortex prémoteur. **B)** Les aires motrices corticales sont toutes interconnectées et projettent vers la moelle épinière. Les afférences sensorielles sont transmises grâce aux cortex pariétal postérieur et somatosensoriel. (Adaptation de (Kandel et al., 2012)).

### 3.2 Organisation fonctionnelle du cortex moteur

Comment s'organise le cortex moteur pour produire les mouvements est une question encore très débattue à l'heure actuelle. Historiquement, plusieurs hypothèses ont été avancées, puis ont été contestées et partiellement invalidées. Les premières hypothèses ont été élaborées grâce aux travaux de Sherrington et Penfield au début du XX<sup>ème</sup> siècle qui ont

procédé à des expériences de stimulation dans diverses régions du cortex moteur de singes. (Grunbaum, 1902; Leyton and Sherrington, 1917). Ces travaux ont permis de dresser une carte topographique du corps contenue dans le cortex moteur primaire. Les pieds sont représentés dans la partie la plus dorsale des hémisphères cérébraux, la bouche dans la partie la plus ventrale et entre les deux se situe les autres parties du corps. Dans cette carte, chaque muscle ou petit groupe musculaire restreint correspond à une région corticale précise. On a donc une représentation somatotopique du corps au niveau cortical. De plus, la genèse du mouvement est vue de façon hiérarchique, avec une activation successive du cortex prémoteur, du cortex moteur primaire, de la moelle épinière et enfin des muscles (Fulton, 1935; Penfield and Boldrey, 1937; Penfield and Welch, 1951). Ces travaux ont depuis été confirmés par des expériences d'IRM fonctionnelle (Grafton et al., 1993; Kleinschmidt et al., 1997; Lotze et al., 2000).

Cependant, la somatotopie est en réalité fracturée, mélangée et chevauchante. Chaque point du cortex moteur primaire ne correspond pas qu'à un seul muscle. De plus, certains muscles sont représentés à différents endroits (Indovina and Sanes, 2001; Rao et al., 1995; Sanes and Schieber, 2001). La connectivité serait donc plus complexe, et serait organisée de sorte à promouvoir la coordination entre les muscles et les articulations plutôt que de séparer distinctement les différents muscles et articulations (Graziano, 2006). La division fonctionnelle du cortex moteur primaire *versus* le cortex prémoteur n'est plus si claire. Les deux structures semblent avoir des fonctions communes et complémentaires. D'autant qu'elles projettent toutes les deux de manières équivalentes et en parallèle vers la moelle épinière avec des patterns qui se chevauchent (Roland, 1984, 1985; Roland et al., 1980a). Les neurones de projection de la couche V du cortex moteur primaire semblent avoir des fonctions très élaborées comme ceux du cortex prémoteur. Ainsi, ils sont capables de coder la direction, la vitesse et la force du mouvement (Davare et al., 2015; Georgopoulos et al., 1992; Georgopoulos et al., 1986; Guigon et al., 2007). Cela suggère que le cortex moteur primaire n'a pas qu'un simple rôle exécutif sous le contrôle du cortex prémoteur. L'idée de carte topographique dans le cortex moteur primaire ne peut donc plus être l'unique description d'une réalité plus complexe (Graziano, 2006).

De récentes expériences de stimulation du cortex moteur primaire et prémoteur chez les primates non humains ont donné lieu à des mouvements complexes, ayant un sens comportemental (Cooke and Graziano, 2004; Graziano et al., 2005; Graziano et al., 2004). Les

auteurs ont classé les régions du cortex moteur en fonction des catégories de mouvements qu'ils génèrent, comme par exemple le mouvement pour aller attraper de la nourriture. Ces études ouvrent la voie à une nouvelle vision du cortex moteur où il n'y a plus de hiérarchie et de différence entre le cortex moteur primaire et le cortex prémoteur. L'organisation du cortex moteur ne serait pas aussi simple qu'une somatotopie mais beaucoup plus complexe, en fonction de groupes musculaires répondant à des fonctions éthologiques. Il se peut très bien que certaines régions soient organisées différemment de leurs voisines, et que plusieurs types d'organisations cohabitent au sein du cortex moteur (Graziano, 2006; Levine et al., 2012).

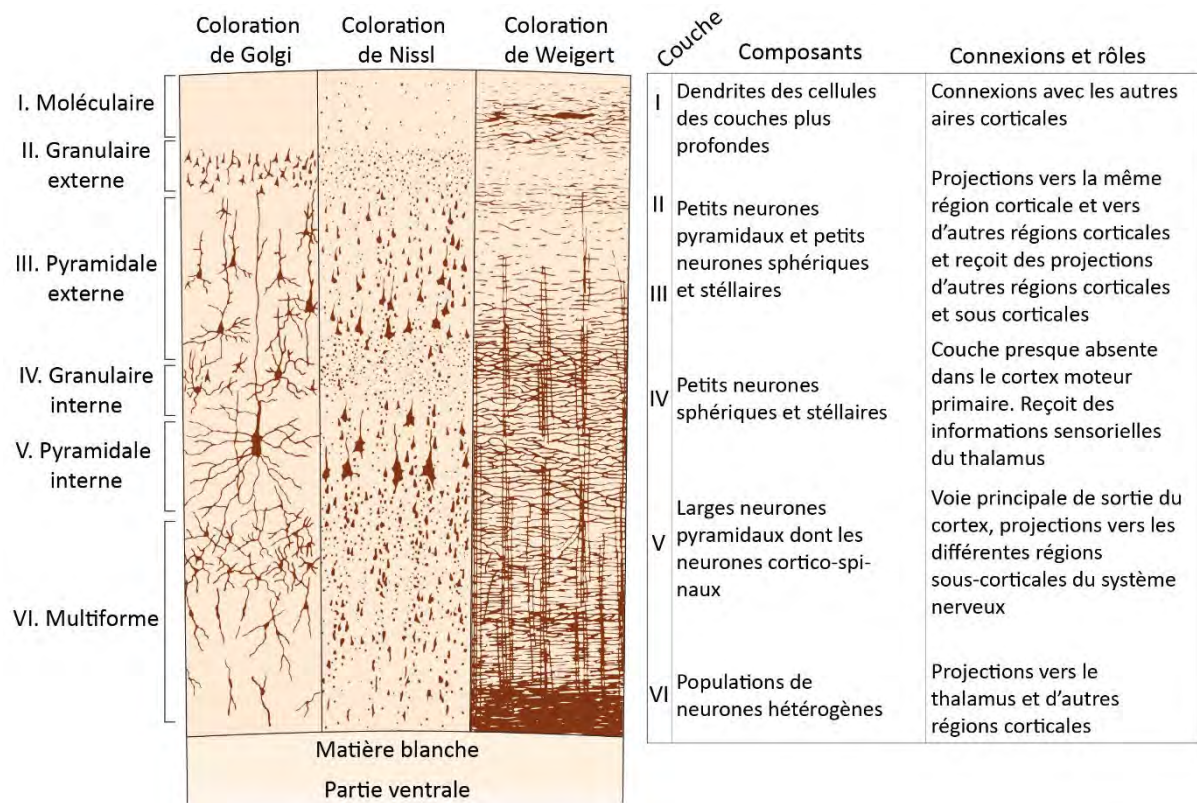
### **3.3 Organisation cytoarchitecturale du cortex moteur**

Au sein du cortex cérébral, on considère que 80% de neurones sont excitateurs contre seulement 20% de neurones inhibiteurs. D'autre part, on distingue les neurones pyramidaux versus les neurones non pyramidaux. Les neurones pyramidaux sont des neurones excitateurs qui envoient leurs axones au sein du cortex ipsilatéral et controlatéral ainsi que vers des cibles lointaines pouvant être des structures sous corticales ou subcérébrales. Les neurones non pyramidaux peuvent être excitateurs ou inhibiteurs et projettent localement pour réguler les circuits neuronaux.

Grâce aux travaux pionnier de Brodmann (1909) et à la description cytoarchitecturale du cortex de l'Homme, on peut classifier le cortex moteur comme étant un isocortex hétérotypique agrulaire à 6 couches (Figure 5). Les couches du cortex se différencient en fonction de leur composition cellulaire. Ces couches sont numérotées de I à VI, de la superficie à la profondeur du cortex. La couche moléculaire (I) est très pauvre en cellules. On y retrouve de nombreuses fibres tangentielles provenant des neurones des couches profondes, notamment les dendrites apicales des neurones pyramidaux. La couche granulaire externe (II) est riche en cellules de petites tailles, notamment des pyramidales et des interneurones. Cette couche reçoit de nombreuses informations des autres régions du cortex. La couche pyramidale externe (III) est composée de neurones pyramidaux de différentes tailles et des interneurones. Elle est généralement divisée en trois parties (IIIa, IIIb, IIIc). C'est la source majeure de connections cortico-corticales. Elle reçoit et projette vers les aires associatives. La couche granulaire interne (IV) est très riche en neurones excitateurs étoilés, mais contient également des neurones excitateurs pyramidaux et des interneurones inhibiteurs. Elle reçoit des informations provenant du thalamus et des régions intra-hémisphériques. La couche

pyramidale interne (V) possède les neurones de projection de forme pyramidale. Elle se divise en deux parties (Va, Vb) en fonction de la taille des cellules pyramidales et de la densité cellulaire. On retrouve ainsi les grandes cellules de Betz dans la partie Vb où la densité cellulaire est forte. Cette couche projette de manière cortico-corticale, corticofuge et subcérébrale. Enfin, la couche VI contient de nombreuses cellules fusiformes ainsi que de petites cellules pyramidales. Elle peut également être divisée en deux parties, VIa qui est dense et VIb qui est peu dense. Elle est réciproquement connectée au thalamus et envoie des informations vers les autres régions corticales. Les couches I, II et III contiennent les dendrites apicales des neurones des couches II, III, V et VI, alors que les couches V et VI contiennent les dendrites basales des neurones des couches III, V et VI (Palomero-Gallagher and Zilles, 2017; Rivara et al., 2003; Shipp, 2007) (Figure 5).

Le cortex moteur primaire est caractérisé par la présence des cellules pyramidales géantes ou cellules de Betz dans la couche V et par le fait que la couche IV est pratiquement inexistante et confondue avec les couches avoisinantes. C'est un cortex qui est très fortement myélinisé (Barbas and Garcia-Cabezas, 2015; Garcia-Cabezas and Barbas, 2014; Palomero-Gallagher and Zilles, 2017). La cytoarchitecture des aires prémotrices est plus hétérogène et légèrement différente du cortex moteur primaire. Il y a un changement graduel de la cytoarchitecture, les aires les plus dorsales ressemblent au cortex moteur primaire et les aires les plus ventrales tendent vers la cytoarchitecture du cortex sensoriel (Barbas and Pandya, 1987). Les neurones excitateurs et inhibiteurs ne représentent qu'une part des cellules qui composent le cortex cérébral (pourcentage variable selon les études, entre 10 et 50%). Ce sont les cellules gliales qui composent l'autre part. Outre leur rôle nourricier, protecteur et de support, les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et microglies) jouent un rôle essentiel dans la communication neuronale et dans la structuration cytoarchitecturale du cortex (Fields and Stevens-Graham, 2002; Nedergaard et al., 2003).

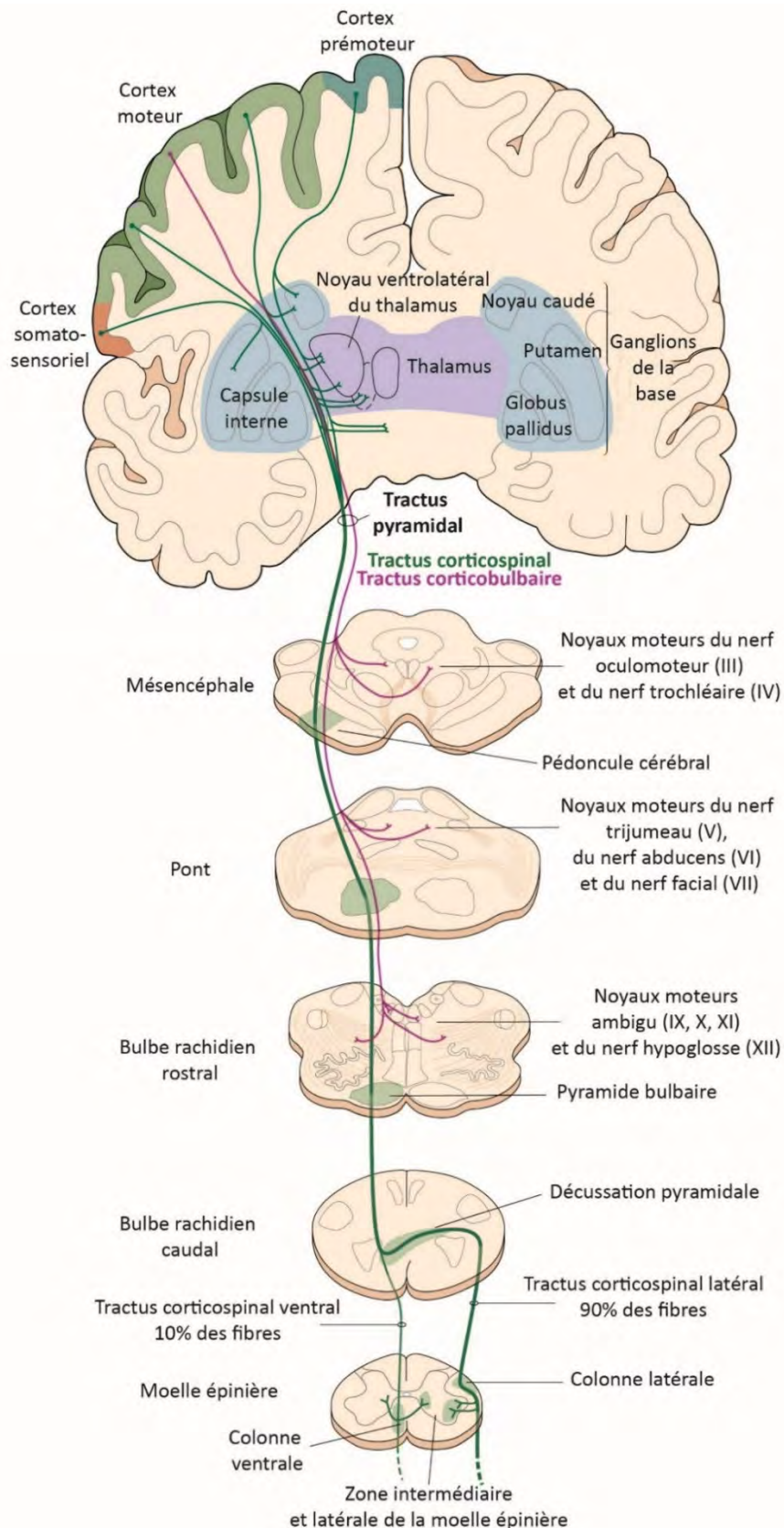


**Figure 5 : Représentation cytoarchitecturale du cortex moteur.** Le cortex cérébral est organisé en 6 couches (notées I à VI). Le cortex moteur est de type agranulaire, c'est-à-dire que la couche IV est très réduite, voire inexistante. Sa couche V est très développée contient de gros neurones pyramidaux, appelés cellules de Betz. Chaque couche contient différents types cellulaires avec un connectome différent, ce qui leur octroie des rôles spécifiques. (Adaptation de (Kandel et al., 2012)).

### 3.4 Voie pyramidale

La voie pyramidale est constituée du tractus corticospinal et du tractus corticobulbaire. Elle est constituée des axones des neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur incluant M1, les aires prémotrices, le cortex cingulaire et le cortex pariétal (Figure 6). On y retrouve également des axones provenant du cortex sensoriel primaire (Jang, 2014; Nudo and Masterton, 1988; Welniarz et al., 2017). La voie pyramidale n'est donc pas limitée à un rôle purement moteur (Lemon, 2008; Lemon and Griffiths, 2005). En effet, le tractus corticospinal est capable de moduler les afférences sensorielles et les réseaux neuronaux spinaux *via* des projections dans la corne dorsale de la moelle épinière (Moreno-Lopez et al., 2016).





**Figure 6 : La voie descendante pyramidale.** Les fibres issues des régions corticales motrices descendent vers le tronc cérébral et la moelle épinière et forment le tractus pyramidal. Il comprend les fibres corticobulbaires qui innervent les neurones des noyaux moteurs du tronc

cérébral, et les fibres corticospinales qui innervent les interneurons et les motoneurons spinaux. 90% des fibres du tractus corticospinal décussent dans les pyramides bulbaires et 10% demeurent ipsilatérales. (Adaptation de (Kandel et al., 2012)).

Concernant le tractus corticospinal, après avoir quitté le cortex, les axones se regroupent en fibres et traversent la capsule interne, puis convergent vers le pédoncule cérébral avant de rentrer dans la partie ventrale du tronc cérébral. En maintenant leur position ventrale, les fibres forment les pyramides bulbaires jusqu'à la partie caudale du bulbe rachidien. A la jonction du tronc cérébral et de la moelle épinière, environ 90% des fibres croisent la ligne médiane et passent d'une position ventrale à une position dorsale. Ces fibres forment la décussation des pyramides bulbaires et continuent leur route dans la partie contralatérale de la moelle épinière. Plus précisément, ces fibres circulent dans la partie dorsale des colonnes latérales. Les 10% des fibres qui n'ont pas décussé au niveau des pyramides bulbaires se retrouvent dans la partie ventrale de la moelle épinière ipsilatérale (Figure 6).

Les fibres ayant décussées sont majoritairement impliquées dans les mouvements fins des extrémités distales alors que les fibres n'ayant pas décussées sont plutôt responsables du maintien de la posture en contrôlant la musculature proximale et axiale (Armand, 1982; Huisman et al., 1981; Jang, 2014; Nathan et al., 1990; Welniarz et al., 2017). Les axones du tractus corticospinal quittent ensuite la substance blanche pour rejoindre la matière grise de la moelle épinière, dans les cornes ventrales et la zone intermédiaire (Huisman et al., 1981; Nathan et al., 1990). Chez l'homme, il existe des connexions monosynaptiques entre les NCS et les MN. Ces fibres proviennent essentiellement de M1 et notamment des axones des cellules de Betz. Les autres fibres contactent des interneurons des circuits locaux de la moelle épinière qui font ensuite synapse avec les MN (de Noordhout et al., 1999).

Concernant le tractus corticobulbaire, les fibres se superposent initialement à celles du tractus corticospinal mais se terminent dans le tronc cérébral, innervant les noyaux moteurs et sensoriels des nerfs crâniens (Kuypers, 1958) (Figure 6). Selon les noyaux, les axones se terminent de manière contralatérale, ipsilatérale ou bilatérale, cette dernière façon étant la plus répandue (Kuypers, 1958).

La voie pyramidale est donc l'intermédiaire entre le cortex, le tronc cérébral et la moelle épinière et permet des connexions directes ou indirectes entre les NCS et les MN.

#### **4. Contrôle sous-cortical de l'unité motrice**

Outre le cortex cérébral, plusieurs structures du tronc cérébral sont impliquées dans l'exécution de mouvements impliquant le contrôle de la musculature axiale et proximale, le maintien de la posture et de l'équilibre ainsi que l'orientation de la tête et du regard. Ces structures qui composent le tronc cérébral reçoivent des informations du cortex et projettent directement ou indirectement sur les MN et les circuits locaux de la moelle épinière. Ils peuvent fonctionner de manière indépendante mais réalisent généralement leurs tâches en synergie avec le cortex cérébral lors de l'exécution des mouvements volontaires. Quatre grands centres régulent l'activité de l'UM : les noyaux vestibulaires, la formation réticulée, les collicules supérieurs et le noyau rouge. Leurs projections vers la moelle épinière forment les voies extrapyramidales.

##### **4.1 Les noyaux vestibulaires**

Les noyaux vestibulaires reçoivent l'information sensorielle en provenance des canaux semicirculaires et des organes otolithiques de l'oreille interne qui permettent de connaître la position de la tête ainsi que la vitesse angulaire et linéaire de son déplacement. Ces noyaux ont donc une fonction importante dans l'équilibre, la coordination, le maintien du regard et l'orientation du regard. Pour cela, ils contrôlent notamment les MN innervant les muscles axiaux et les muscles proximaux des membres (McCrea et al., 2001; Sadjadpour and Brodal, 1968; Suarez et al., 1997). Les noyaux vestibulaires sont au nombre de quatre, on retrouve le noyau vestibulaire latéral, médial, supérieur et inférieur. Ils sont situés dans la partie dorsale du pont et du bulbe rachidien au sein du tronc cérébral (Barmack, 2003). Les informations sensorielles provenant de l'oreille interne sont véhiculées vers les noyaux vestibulaires *via* le huitième nerf crânien. Les neurones qui reçoivent cette information sont généralement les neurones qui envoient leurs axones vers la moelle épinière (Highstein and Holstein, 2006). Il existe des liens réciproques entre les noyaux vestibulaires et le cortex cérébral, notamment entre l'aire prémotrice et le cortex cingulaire (Highstein and Holstein, 2006).

##### **4.2 La formation réticulée**

La formation réticulée est un ensemble complexe de clusters neuronaux entrecoupés par le passage de fibres. Cette structure, difficile à séparer sur le plan anatomique, s'étend de



la partie rostrale du mésencéphale, à travers le pont, jusqu'à la partie caudale du bulbe rachidien à la frontière de la moelle épinière. Les neurones de la formation réticulée peuvent avoir des rôles très divers dans les fonctions cardiovasculaires, respiratoires, la gestion du rythme veille/sommeil et dans les réponses nociceptives (Siegel, 1979). D'un point de vue moteur, la formation réticulée intervient dans plusieurs types de mouvements. On retrouve son implication dans la locomotion, le contrôle postural, l'orientation du regard, les saccades oculaires, la préparation des mouvements fins oculaires et enfin dans le contrôle spatial et temporel des mouvements du tronc et des membres (Baker, 2011; Buford and Davidson, 2004; Cowie and Robinson, 1994; Pompeiano, 1973). Les neurones envoyant leurs axones vers la moelle épinière se trouvent dans la partie pontomédullaire (Huisman et al., 1981). Il existe également de fortes interconnexions réciproques entre le cortex moteur, prémoteur et la formation réticulée (French, 1957).

### **4.3 Les collicules supérieurs**

Les collicules supérieurs sont localisés dans la partie dorsale du mésencéphale. Ils reçoivent de nombreuses informations sensorielles qu'ils vont ensuite intégrer pour être en mesure de contrôler les mouvements de la tête et du regard *via* l'activation des muscles du cou et des muscles oculomoteurs. Leur fonction est de diriger les structures sensorielles de la tête vers un point d'intérêt (May, 2006). Les collicules supérieurs sont une structure laminaire organisée en couches, basée sur la distribution des fibres, la taille et la densité des neurones. Ce sont les couches profondes qui projettent vers la moelle épinière et les MN du noyau oculomoteur. Mais la sortie première se dirige vers la formation réticulée qui sert alors de relais vers la moelle épinière (May, 2006; May and Porter, 1992). Là encore, la structure reçoit des efférences du cortex cérébral (Lock et al., 2003; Marrocco, 1978; Tigges and Tigges, 1981).

### **4.4 Le noyau rouge**

Le noyau rouge est un cluster neuronal bilatéral appartenant au mésencéphale. Il est divisé en deux parties, une partie parvocellulaire dorsolatérale et une partie magnocellulaire ventrocaudale (Massion, 1967; Massion, 1988; Nudo and Masterton, 1988; Onodera and Hicks, 2010; Verhaart, 1962). D'un point de vue évolutif, les fonctions premières du noyau rouge sont motrices. Ainsi, il est impliqué dans l'extension des muscles distaux des membres

supérieurs et dans les mouvements de la main et des doigts. Il participe également au mouvement des membres lors de la locomotion (Belhaj-Saif and Cheney, 2000; Gibson et al., 1985; Hicks and Onodera, 2012; Lawrence and Kuypers, 1968b). Le noyau rouge est constitué de deux efférences majeures, une vers l'olive inférieure du cervelet à partir de la partie parvocellulaire et une vers la moelle épinière et les MN à partir de la partie magnocellulaire. Certains neurones de la partie parvocellulaire peuvent néanmoins projeter vers la moelle épinière (Kennedy et al., 1986; Miller and Strominger, 1973; Strominger et al., 1979). Ces fibres se regroupent pour former le tractus rubrospinal.

Le Noyau rouge partage de nombreuses similitudes anatomiques et fonctionnelles avec le cortex moteur. En effet, les deux structures envoient des axones vers la moelle épinière dans les colonnes latérales et finissent leurs courses dans la zone intermédiaire et la corne ventrale pour aller contacter directement ou indirectement les MN (Kennedy et al., 1986; Kuypers, 1964). Ils gèrent ainsi l'activité de la musculature proximale et distale des membres. Il a également été montré que ces deux tractus sont glutamatergiques (Beitz and Ecklund, 1988).

#### **4.5 Les voies extrapyramidales**

Les différents tractus regroupant les fibres efférentes des noyaux vestibulaires, des collicules supérieurs, de la formation réticulée et au noyau rouge sont regroupés sous l'appellation de voies extrapyramidales en opposition aux voies pyramidales qui partent du cortex (Kuypers, 1964). Le système extrapyramidal est organisé anatomiquement en parallèle du système pyramidal. Les deux systèmes ayant des fonctions complémentaires, ils ne doivent pas être mis en opposition (de Oliveira-Souza, 2012). Dans le tronc cérébral, les fibres des voies pyramidales passent par le faisceau longitudinal médian et par le tractus tegmental central (Figure 7). Au niveau de la moelle épinière, les fibres de ces deux voies descendantes traversent respectivement les colonnes latérales et ventrolatérales (de Oliveira-Souza, 2012). Cependant, la totalité de fibres issues des noyaux moteurs du tronc cérébral ne voyage pas dans ces axes. Une proportion non déterminée utilise d'autres routes (de Oliveira-Souza, 2012).

Les fibres issues des noyaux vestibulaires peuvent se diviser en deux tractus distincts de par leurs origines et de par leurs fonctions mais voyageant de façon parallèle. Le tractus vestibulospinal médian et le tractus vestibulospinal latéral regroupent respectivement les

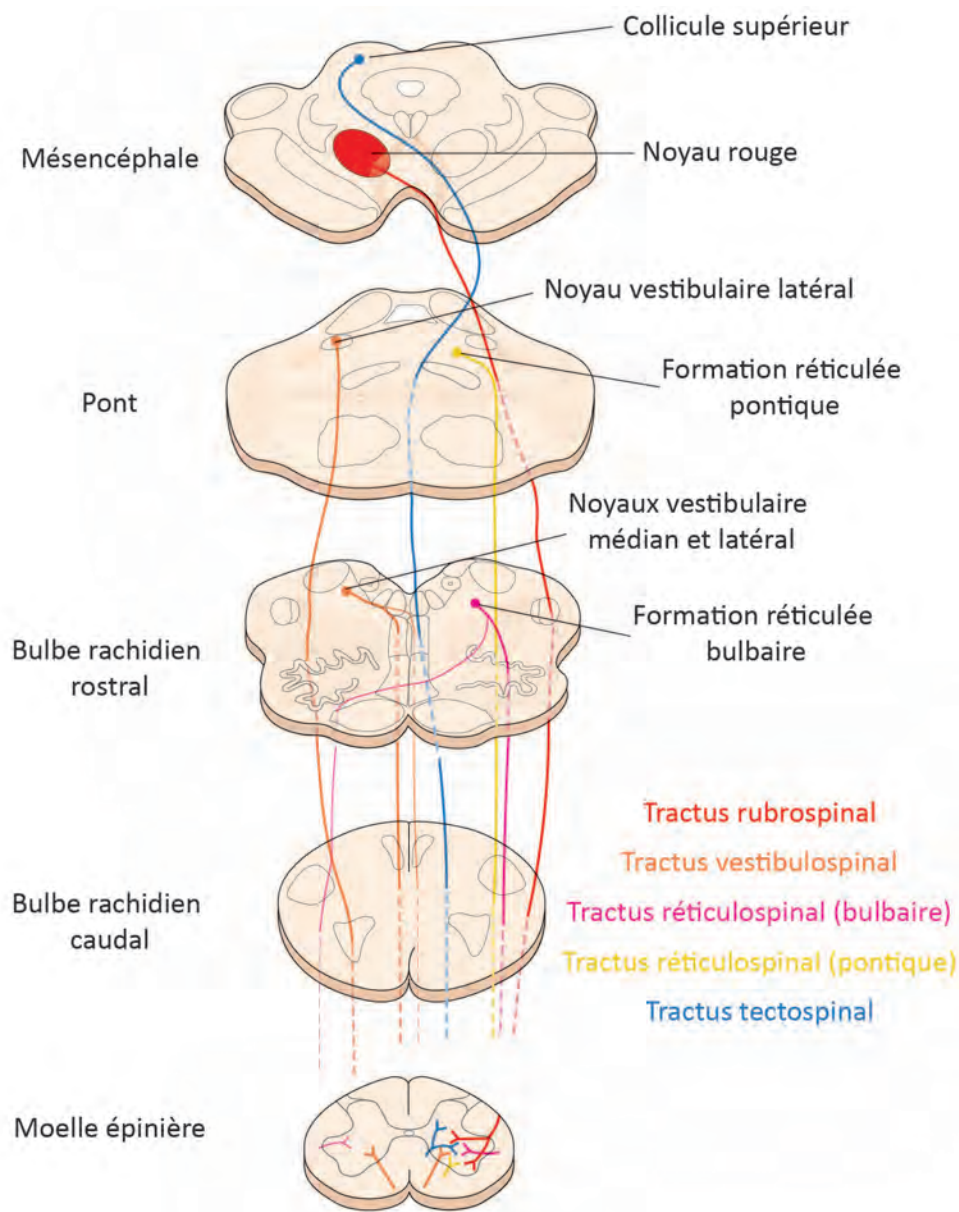
fibres du noyau vestibulaire médian et du noyau vestibulaire latéral. Au niveau du tronc cérébral, ces fibres circulent dans le faisceau longitudinal médian de manière ipsilatérale. Le tractus vestibulospinal médian va innover, dans la corne ventrale de la moelle épinière, les MN responsables du contrôle des muscles du cou pour réguler la position de la tête et du regard. Le tractus vestibulospinal latéral va innover les MN contrôlant les muscles extenseurs antigraavités impliqués dans le maintien de la posture. Ce tractus contacte également les muscles proximaux des membres (Horak, 2009)(Figure 7).

De même, les fibres provenant de la formation réticulée se séparent en deux tractus, un médian, issu de la formation réticulée pontique, et un latéral, issu de la formation réticulée médullaire. Les axones des neurones du tractus réticulospinal médian ne décussent pas et rejoignent le faisceau longitudinal médian pour ensuite gagner la corne ventrale de la moelle épinière. Au contraire, les axones des neurones du tractus réticulospinal latéral croisent directement la ligne médiane pour occuper une position médiane et rentrer dans le tractus tegmental central. Ces deux tractus ont des effets opposés ayant des rôles dans la locomotion et le maintien de la posture. Le tractus réticulospinal médian est responsable du contrôle des MN innervant les muscles extenseurs axiaux alors que le tractus réticulospinal latéral innerve les MN des muscles fléchisseurs. (Davidson et al., 2007). A eux deux, ils coordonnent l'activité de différents muscles en activant les interneurones propriospinaux projetant sur de longues distances et régulent la posture et la musculature distale *via* des interneurones propriospinaux à projections courtes (Baker, 2011; Buford and Davidson, 2004; Nathan et al., 1996)(Figure 7).

Les fibres issues des collicules supérieurs et arrivant dans la corne ventrale dorsomédiale et intermédiaire de la moelle épinière forment le tractus tectospinal. Dans le tronc cérébral, après décussation au niveau de l'aire tegmentale ventrale, ces fibres passent autour de la substance grise périaqueducule en position ventromédiane et terminent dans la partie ventromédiane de la moelle épinière. Les axones passant dans le tractus tectospinal terminent leur course dans les niveaux cervicaux et thoraciques supérieurs pour aller innover les muscles du cou et du tronc et diriger la tête et le regard (May and Porter, 1992).

Chez l'Homme, les quelques fibres issues du noyau rouge voyagent de façon parallèle aux fibres du tractus corticospinal latéral. Ils décussent dans l'aire tegmentale ventrale pour finalement innover la partie intermédiaire de la moelle épinière (Figure 7). A titre de comparaison, le noyau rouge envoie entre 10 et 15 axones contre plus de 100.000 pour le tractus corticospinal (Nathan and Smith, 1982). Le tractus rubrospinal innerve la musculature

distale des membres supérieurs et régule la force, la vélocité et la direction du mouvement. Ce tractus excite les MN contrôlant le tonus des muscles fléchisseurs et inhibe les extenseurs durant le mouvement. (Hicks and Onodera, 2012; Kennedy et al., 1986).



**Figure 7 : Les voies descendantes extrapyramidales.** Les fibres issues des différents noyaux moteurs du tronc cérébral descendent vers la moelle épinière pour former les voies extrapyramidales qui regroupent les tractus rubrospinal, vestibulospinal, réticulospinal et tectospinal. Chaque tractus voyage séparément et va innover différentes cibles au sein de la corne ventrale de la moelle épinière. (Adaptation de (Kandel et al., 2012)).

## **5. Différences entre le système moteur de l'Homme et des rongeurs**

Le travail de cette thèse est basé sur l'étude de souris modélisant une maladie retrouvée uniquement chez l'Homme, la sclérose latérale amyotrophique, ou SLA. Il est donc important d'avoir à l'esprit les différences entre le système moteur humain et murin, bien que celui-ci soit très bien conservé chez les mammifères. Ce sont principalement les différences comportementales qui vont expliquer les différences retrouvées entre les deux systèmes moteurs. En effet, l'Homme est une espèce bipède alors que les souris sont quadrupèdes. De plus, l'Homme a gagné de nombreuses fonctions cognitives et certaines habilités motrices comme le pouce opposable et la capacité d'exercer des mouvements fins d'une incroyable précision (Gu et al., 2017; Lemon, 2008; Lemon et al., 2004).

### **5.1 Anatomie et physiologie comparative**

Les blocs élémentaires qui constituent le système moteur sont retrouvés chez tous les mammifères (Nudo and Masterton, 1988; ten Donkelaar, 1988). L'émergence progressive du tractus corticospinal (TCS) chez les mammifères a permis le développement des nouvelles capacités motrices propres aux primates et à l'Homme (Huisman et al., 1981). Le système pyramidal est dominant chez l'Homme tandis que chez la souris, c'est le système extrapyramidal qui est dominant et assure notamment les connections directes avec les MN (Lemon, 2008). Au cours de l'évolution, le changement de dominance d'un système à l'autre permet d'expliquer les différences comportementales. Ainsi, la proportion du néocortex et du TCS a nettement augmenté chez les primates et chez l'Homme (Lemon et al., 2004; Nudo and Masterton, 1990). Les axones du TCS sont passés d'une position dorsale dans la moelle épinière des souris (Uematsu et al., 1996a, b) à une position latérale chez l'Homme (Davidoff, 1990; Huisman et al., 1981; Nathan et al., 1990) (Tableau 1). De plus, il existe des différences qualitatives et quantitatives dans la manière dont vont terminer les fibres du TCS dans la moelle épinière. Chez les souris, le TCS projette principalement vers les cornes dorsales et la zone intermédiaire de la moelle épinière (Kuypers, 1982; Uematsu et al., 1996a). Chez l'Homme, le TCS innerve plutôt la corne ventrale et également la zone intermédiaire (Bortoff and Strick, 1993; Kuypers, 1982; Nathan et al., 1990) (Tableau 1). Les différences comportementales peuvent aussi être expliquées par le type de connections entre les NCS et les MN. En effet, chez l'Homme, les NCS sont capables de réaliser des connexions

monosynaptiques avec les MN et indirectes polysynaptiques *via* des interneurons (Huisman et al., 1981; Lemon, 2008). Chez l'homme, les muscles responsables des mouvements sont innervés par une grande proportion de MN recevant des connexions monosynaptiques. Cela donne l'avantage à l'Homme d'avoir un indice de dextérité manuel très élevé (Lemon, 2008). Chez les rongeurs, les quelques connexions monosynaptiques existantes sont éliminées dans les premiers jours de la vie postnatale (Gu et al., 2017) et il ne reste que des connexions polysynaptiques entre les NCS et les MN (Alstermark et al., 2004). Il existe donc une forte corrélation entre le nombre de connexions monosynaptiques et le degré de dextérité manuel, qui est maximal chez l'homme (Gu et al., 2017; Lemon, 2008; Lemon et al., 2004).

Au cours de l'évolution, le néocortex s'est fortement développé et a pris une place importante dans le système moteur. Cela s'est notamment fait au détriment des noyaux moteurs du tronc cérébral comme le noyau rouge, la formation réticulée, les noyaux vestibulaires et les collicules supérieurs. L'exemple le plus frappant est celui du noyau rouge qui est vestigial chez l'homme. Le tractus rubrospinal contient un nombre très limité de fibres projetant vers la moelle épinière, avec une importance toute relative dans les fonctions motrices (Hicks and Onodera, 2012; Nathan and Smith, 1982; Onodera and Hicks, 2010). Ce noyau rouge sert essentiellement de relais des informations en provenance de l'olive inférieure du cervelet. En revanche, chez la souris, ce noyau est fortement développé et possède de nombreux neurones glutamatergiques qui projettent vers la moelle épinière (Liang et al., 2012). A titre comparatif, chez l'Homme le noyau rouge possède 10 à 15 neurones de projections alors que la souris en possède plus de 3000 (Liang et al., 2012; Nathan and Smith, 1982).

L'unité motrice (UM) peut différer selon les espèces (Manuel et al., 2019). En termes de taille, les muscles de l'Homme contiennent beaucoup plus de fibres musculaires que ceux des souris, il faut donc plus d'UM pour les innerver. De plus, la taille de l'axone du MN qui va innerver les fibres est beaucoup plus important et peut atteindre le mètre chez l'Homme (Manuel et al., 2019). Le MN en lui-même est plus gros chez l'Homme, son arbre dendritique est plus imposant (Krutki et al., 2006). Cela répond notamment à la demande physiologique puisque les muscles de l'Homme vont développer une force plus importante (Manuel and Heckman, 2011). A noter également que les propriétés électrophysiologiques des MN sont propres à chaque espèce (Huh et al., 2017; Manuel et al., 2019).

Espèce	Tractus moteurs dominants	Localisation des fibres du TCS	Nombre de fibres du TCS	Type de connexion entre NCS et MN	Effet d'une lésion du TCS
<b>Homme</b>	Tractus corticospinal latéral et ventral	Colonnes latérales de la moelle épinière	1.101.000	Monosynaptique et polysynaptique	Perte de la locomotion et dommages permanents de fonctions manuelles
<b>Rongeur</b>	Tractus rubrospinal et voies corticobulbaires	Colonnes médianes de la moelle épinière	137.000	Polysynaptique	Pas d'effet sur la locomotion. Altération de la dextérité manuelle suivit d'une récupération

**Tableau 1 : Comparaison des systèmes moteurs de l'Homme et des rongeurs (rat et souris).**

Abréviations : MN : motoneurone ; NCS : neurones corticospinaux ; TCS : tractus corticospinal.

## 5.2 Effets différentiels des lésions

Le système moteur murin est beaucoup plus apte à compenser une lésion que celui de l'Homme, ainsi les réponses à des traumatismes du cortex ou du TCS ou de la moelle épinière peuvent être très différentes (Courtine et al., 2007). Chez l'Homme, une lésion de la moelle épinière impliquant la destruction du TCS a des effets dramatiques, délétères et irréversibles. Ce type de lésion induit chez l'Homme une paralysie totale ou incomplète, une parésie et une abolition des réflexes. En revanche, chez les rongeurs, les effets d'une telle lésion sont nettement moindres et les animaux sont capables de récupérer une motricité normale après environ un mois. Seule la motricité fine est atteinte et il n'y a pas d'altération majeure de la locomotion lors d'une lésion du TCS (Courtine et al., 2005; Leblond et al., 2003; Muir and Whishaw, 1999; Raineteau and Schwab, 2001; Starkey et al., 2005) (Tableau 1).

Ces différences frappantes s'expliquent par les différences d'anatomie et notamment la proportion du TCS mais aussi par la plasticité du système moteur murin et sa capacité à créer des moyens de compensations relativement efficaces. Plusieurs mécanismes peuvent venir compenser la perte des fibres du TCS, comme la réorganisation des circuits locaux de la moelle épinière, la réorganisation des neurones propriospinaux et l'élaboration de nouvelles connexions soit des fibres endommagées soit de nouvelles fibres (Raineteau and Schwab,

2001; Rossignol et al., 2009). Les améliorations fonctionnelles constatées chez les rongeurs ont été attribuées à la capacité des fibres lésées de refaire de nouvelles connexions *via* de nouveaux circuits (Courtine et al., 2008; Raineteau et al., 2002) mais aussi par la capacité du TCS non lésé, dans le cas de lésion unilatérale, à faire des collatérales du côté affecté de la moelle épinière (Cafferty and Strittmatter, 2006). Les noyaux moteurs du tronc cérébral sont également capables de se réorganiser, c'est notamment le cas du noyau rouge (NR) (Raineteau and Schwab, 2001).

En effet, il a été montré qu'après lésion du TCS, le NR peut servir de relais entre le cortex et la moelle épinière. Ainsi, le cortex va émettre de nouvelles efférences vers le NR (Z'Graggen et al., 2000) qui ira à son tour émettre de nouvelles projections vers la moelle épinière pour recréer le lien entre les centres supérieurs et inférieurs (Siegel et al., 2015). Le noyau rouge est également capable d'envoyer de nouvelles efférences vers le noyau du raphé, qui est connu pour envoyer des projections sérotoninergiques vers la moelle épinière (Siegel et al., 2015). Une autre étude a montré que l'absence congénitale du TCS induit une plasticité spontanée. Les auteurs ont tiré profit du croisement des souris *Celsr3/Emx1* qui leur permet d'inactiver spécifiquement *Celsr3* dans les neurones du cortex grâce au promoteur *Emx1* et un système *Cre-Lox*. Cette inactivation abolit la formation du TCS (Han et al., 2015). Les souris *Celsr3/Emx1* sont hyperactives et présentent des déficits moteurs, notamment lors de la manipulation de croquettes. En s'intéressant aux différents noyaux moteurs du tronc cérébral (noyau rouge, formation réticulée et noyaux vestibulaires), les auteurs ont observé un nombre plus important de projections provenant du noyau rouge par rapport aux souris sauvages. Le noyau rouge est donc capable de compenser l'absence de TCS, contrairement aux autres noyaux moteurs, dans cette étude (Han et al., 2015).

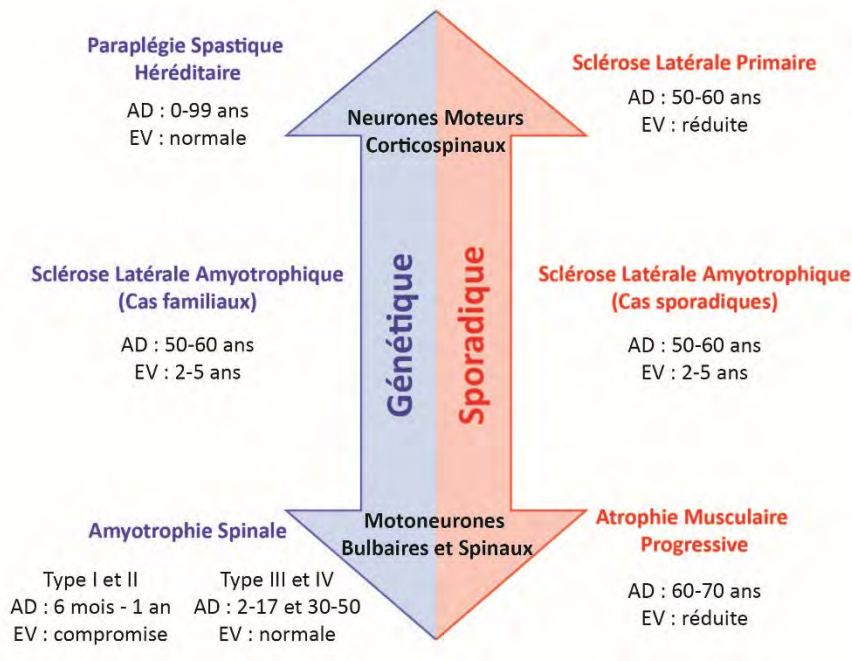
Le noyau rouge n'est pas le seul noyau moteur à pouvoir compenser les effets d'une lésion du TCS. De nombreuses autres études ont montré l'importance de la formation réticulée et de ses projections *via* le tractus réticulospinal (Ballermann and Fouad, 2006; Umeda et al., 2010; Wen et al., 2018). De plus, lors de lésions, les noyaux moteurs vont également réorganiser leurs connexions et envoyer de nouvelles projections entre eux (Siegel et al., 2015). Le remodelage des projections sérotoninergiques, provenant des noyaux raphé, est également un évènement important de la mise en place des compensations lors des lésions chez les rongeurs (Han et al., 2015; Murray et al., 2010).



Les études de lésions du TCS soulignent l'importance des différences entre les systèmes murin et humain dans la recherche préclinique. Elles pointent également l'importance du noyau rouge chez les rongeurs et sa capacité à compenser les effets de la perte du TCS. De plus, chez les rongeurs, les lésions du tractus rubrospinal sont beaucoup plus délétères que les lésions du TCS (Muir et al., 2007).

## 6. Maladies du système moteur

Outre les lésions des fibres participant à l'élaboration du mouvement, des accidents vasculaires cérébraux et des tumeurs localisées au sein du système moteur, il existe plus de 200 maladies neuromusculaires. Ces diverses maladies peuvent atteindre les neurones responsables du mouvements (Maladies neurodégénératives), les nerfs (Neuropathies périphériques), la jonction neuromusculaire (Myasthénies) et le muscle (Myopathies et dystrophies). Parmi les maladies neurodégénératives, on peut distinguer trois catégories : 1) celles affectant uniquement les NCS. On y trouve la sclérose latérale primaire et la paraplégie spastique héréditaire. 2) Celles affectant uniquement les MN. Ce groupe contient l'atrophie musculaire progressive et l'amyotrophie spinale. 3) Celle affectant conjointement les NCS et les MN. C'est la particularité de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) (Deenen et al., 2015; Swash, 2012) (Figure 8).



**Figure 8 : Exemples de maladies du système moteur.** Certaines maladies affectent les neurones corticospinaux (paraplégie spastique héréditaire ; sclérose latérale amyotrophique)

ou les motoneurones bulbaires et spinaux (amyotrophie spinale ; atrophie musculaire progressive). Elles peuvent être héréditaires ou sporadiques. La sclérose latérale amyotrophique est caractérisée par une atteinte conjointe et sélective des neurones corticospinaux et des motoneurones bulbaires et spinaux.

### **6.1 Maladies affectant les neurones corticospinaux**

La dégénérescence sélective et progressive des NCS peut conduire à deux maladies rares qui sont la Sclérose Latérale Primaire et la Paraplégie Spastique Héréditaire (Figure 8).

La Sclérose Latérale Primaire est une maladie sporadique qui se déclenche chez des patients âgés de 40 à 60 ans. Il existe également une forme juvénile liée à la mutation du gène *Alsin* (*ALS2*) (Panzeri et al., 2006; Yang et al., 2001). Les principaux symptômes sont le développement progressif d'une faiblesse musculaire et d'une spasticité, principalement dans les membres mais aussi au niveau du cou et de la face. Progressivement, des raideurs et de l'incoordination sont retrouvées, des signes typiques de l'atteinte des NCS. Des signes bulbaires sont retrouvés et incluent des troubles du langage et de la déglutition. Le développement de la sclérose latérale primaire est très lent et il semblerait qu'il n'affecte pas l'espérance de vie des patients (Singer et al., 2007). Le diagnostic repose sur la mise en évidence des signes de l'atteinte des NCS et de l'absence de signes de l'atteinte des MN, tels que l'atrophie musculaire et la présence de fasciculations ou de dénervations. C'est donc un diagnostic d'exclusion et il ne peut être certains qu'après plusieurs années d'études pour exclure toutes apparitions tardives d'autres signes d'une autre maladie (Gordon et al., 2009; Gordon et al., 2006). Le traitement est symptomatique et non pas curatif (Singer et al., 2007).

La Paraplégie Spastique Héréditaire désigne un groupe hétérogène de maladies héréditaires atteignant plus de 50 gènes (Landouere et al., 2013). Il existe donc une forte diversité clinique et la paraplégie spastique héréditaire peut se déclencher très tôt dans l'enfance jusque vers 60 ans. Le point commun de tous ces cas est la présence de signes de l'atteinte des NCS, de faiblesses musculaires et d'une spasticité dans les membres inférieurs des patients. Certaines formes dites complexes, peuvent présenter d'autres signes cliniques comme des ataxies, des démences, des épilepsies, etc. (Fink, 2013). Les patients ayant des formes simples, qui ne présentent que des signes de l'atteinte des NCS, ont une espérance de vie normale, n'ont pas de perte de dextérité, de force ou de coordination et ne présentent pas de trouble du langage ou de la déglutition. L'évolution est généralement lente mais elle peut

être très différente selon les patients en fonction de l'âge de déclenchement et des mutations. Ici aussi, le traitement est uniquement symptomatique et non curatif (Fink, 2013).

## 6.2 Maladies affectant les motoneurones

Plusieurs maladies rares sont causées par la dégénérescence progressive des MN des cornes ventrales de la moelle épinière et du tronc cérébral. Cette atteinte est retrouvée dans les cas d'Amyotrophie Spinale et dans l'amyotrophie spinale et bulbaire ou maladie de Kennedy (Figure 8).

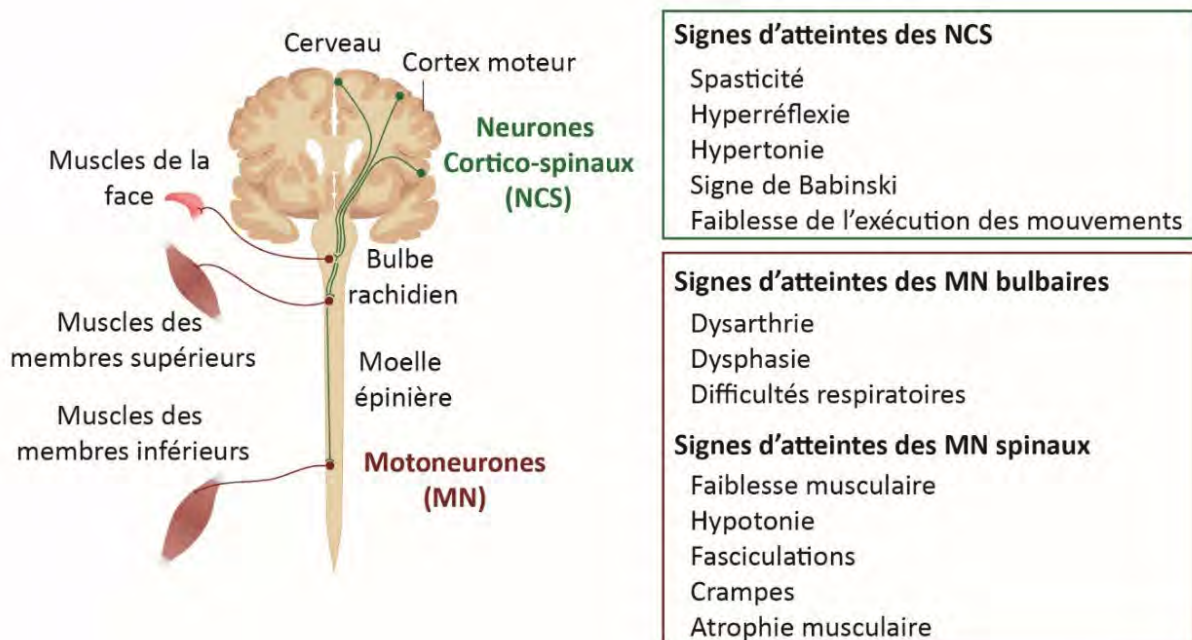
Les Amyotrophies Spinales sont des maladies génétiques résultants de la mutation du gène encodant la protéine SMN. Elles sont classées en fonction de l'âge d'apparition et de la progression des symptômes (Brahe et al., 1995; Wirth, 2000). L'amyotrophie spinale de type I se déclare dès les premières semaines de la vie et provoque une grande faiblesse musculaire rendant le maintien de la tête et de la position assise difficile pour l'enfant. De plus, les patients peuvent rencontrer des difficultés de déglutition et de respiration, ce qui réduit très fortement leur espérance de vie, qui généralement ne dépasse pas les 2 ans (Dubowitz, 1999). L'amyotrophie spinale de type II commence entre 6 mois et 3 ans, par une faiblesse et une atrophie musculaire. Son évolution est lente et touche progressivement les muscles des jambes et du tronc. Les muscles de la respiration peuvent être atteints, c'est d'ailleurs ce point-là qui définit l'espérance de vie des patients, qui est très variable (Rudnik-Schoneborn et al., 2001). L'amyotrophie spinale de type III se retrouve chez des enfants entre 3 et 4 ans ayant un affaiblissement musculaire progressif conduisant à des troubles de la marche et de la station debout. Leur espérance de vie est normale car il n'y a pas d'atteinte des fonctions respiratoires (Rudnik-Schoneborn et al., 2001). L'amyotrophie spinale de type IV se présente chez l'adulte et provoque une paralysie progressive des muscles des membres inférieurs. Il peut y avoir une atteinte des muscles de la respiration mais généralement l'espérance de vie est normale. Le diagnostic de ces maladies est simple et se fait par une analyse ADN sur une prise de sang pour détecter la mutation du gène *SMN1* (D'Amico et al., 2011).

L'atrophie musculaire progressive est une maladie neurodégénérative sporadique rare atteignant les MN. Cette maladie est plus fréquente chez l'homme que chez la femme (ratio homme/femme 3:1) (Liewluck and Saperstein, 2015). Elle se déclenche chez l'adulte entre 60 et 70 ans et se caractérise par une atrophie et une faiblesse musculaire accompagnées de fasciculations. Généralement, les faiblesses musculaires se retrouvent dans les muscles

distaux des membres inférieurs, avec une distribution asymétrique et une propagation de région en région qui se fait entre plusieurs mois et plusieurs années. Des symptômes bulbaires peuvent être présents mais se manifestent généralement tardivement dans la progression de la maladie (Kim et al., 2009). De manière intéressante, de récentes études ont montré que le cerveau de certains patients présentait des inclusions cytoplasmiques typiques de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et des signes de dégénérescence des NCS (Geser et al., 2011; Ince et al., 2003; Riku et al., 2014). Ainsi, cette maladie serait un variant phénotypique de la SLA avec uniquement symptômes reflétant l'atteinte des MN et surtout un meilleur pronostic vital malgré l'issue fatale (Juntas Morales et al., 2017).

### 6.3 Sclérose Latérale Amyotrophique

Parmi les maladies neurodégénératives des neurones moteurs adultes décrites précédemment, la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est la plus fréquente. La dégénérescence conjointe et sélective des NCS et des MN lui confère des caractéristiques propres qui rendent le pronostic particulièrement sévère (Figure 9). En effet, à partir du diagnostic, l'évolution est très rapide, de 2 à 5 ans, et son issue demeure fatale. L'étiologie reste pour l'heure encore mal comprise.



**Figure 9 : Les signes cliniques de la dégénérescence des NCS et des MN.** La dégénérescence de chaque population neuronale conduit à des signes cliniques distincts. L'ensemble de ces signes conduisent à la paralysie progressive des muscles. (Adaptation de (Taylor et al., 2016)).

# CHAPITRE II : La sclérose latérale amyotrophique

## 1. Aspects cliniques

### 1.1 Historique et définitions

Les premières descriptions cliniques remontent à la première moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle par plusieurs médecins comme Bell (1824), Aran (1850), Duchenne (1851) et Cruveilhier (1853) (Wijesekera and Leigh, 2009). Chacun de ces personnages historiques a apporté des éléments de base à la description de la maladie qui est restée incomplète jusqu'en 1869. C'est à cette date que le père fondateur de la neurologie moderne, le médecin français Jean-Martin Charcot, donne une description complète la maladie (Charcot, 1869). Il développe et applique une nouvelle méthode clinico-pathologique qui lui permet de relier les symptômes observés aux altérations pathologiques présentes dans le cerveau, la moelle épinière et les muscles. On lui doit ainsi le nom descriptif de Sclérose Latérale Amyotrophique et le nom éponyme de maladie de Charcot (Goetz, 2000; Rowland, 2001; Wijesekera and Leigh, 2009).

Depuis son élaboration par Charcot en 1869, la description clinique de la SLA n'a pas beaucoup évolué et on définit toujours la SLA comme étant une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte conjointe et sélective des neurones corticospinaux (NCS) et des motoneurones bulbaires et spinaux (MN) conduisant à la paralysie musculaire progressive puis à la mort (Figure 9). D'un point de vue étymologique, « amyotrophique » renvoie à l'atrophie des fibres musculaires observée chez les patients. « latérale » fait référence au tractus corticospinal qui passe dans la partie latérale de la moelle épinière et qui dégénère donnant lieu à une « sclérose », c'est-à-dire un durcissement du tissu, remplacé par des glies, formant ainsi une cicatrice (Wijesekera and Leigh, 2009).

### 1.2 Épidémiologie

La SLA est classée parmi les maladies rares, pourtant elle est la maladie la plus fréquente du neurone moteur adulte (Worms, 2001).

### **1.2.1. Incidence et prévalence**

En France, l'incidence est de 3,19/100.000/an d'après le registre FRAlim. Cela indique entre 3 et 4 nouveaux diagnostics par jour, représentant en 2016 plus de 6000 patients en France (Couratier et al., 2016; Marin et al., 2014).

En Europe, la prévalence est de 1,1-8,2/100.000 et l'incidence est de 2-3/100.000/an dans la population générale âgée de plus de 15 ans (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Couratier et al., 2016). L'incidence augmente après 40 ans pour atteindre un maximum autour de 70 ans, puis elle se stabilise et finit par décliner rapidement après 80 ans (Logroscino et al., 2008). Il existe des disparités liées au genre. En effet, le ratio homme/femme varie entre 1,2 et 1,5 (Manjaly et al., 2010). Le risque de développer une SLA au cours de sa vie est de 1/350 pour les hommes et de 1/400 pour les femmes (Johnston et al., 2006). Les incidences et prévalences seraient plus faibles dans les populations avec des ancêtres d'origines différentes que dans les populations européennes, où il y a plus d'ancêtres en commun (Chio et al., 2013; Cronin et al., 2007). Cependant, la faiblesse des études dans certains pays ne nous permet pas de dire avec certitudes qu'il existe des différences entre les populations autour du globe (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Couratier et al., 2016).

### **1.2.2. Répartition géographique**

La répartition géographique des patients SLA est mal caractérisée en raison du manque de données ou de problèmes d'uniformisation de collecte des données. Globalement, il n'existe pas de différence de répartition des cas de SLA. Cependant, il existe des clusters de patients SLA qui sont très bien définis temporellement et spatialement (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Couratier et al., 2016). Ainsi, on retrouve une incidence élevée dans les tribus Chamorro qui vivent sur l'île de Guam dans le pacifique (Arnold et al., 1953; Koerner, 1952). Ces patients présentent une forme de SLA atypique souvent couplée à des symptômes de Parkinson et de démence. Ces cas-là ont été corrélés avec le régime alimentaire qui présentait de fort taux de cyanotoxines, sans qu'aucune étude ne puisse montrer de liens de cause à effet (Bradley and Mash, 2009). Dans la péninsule de Kii sur l'île d'Honshu au Japon, plusieurs cas de SLA ont été diagnostiqués et reliés, dans ce cas-là, à une mutation par extensions répétitives d'hexanucléotides dans le gène *C9ORF72* (Ishiura et al., 2012). Ces particularités

ont amené la communauté scientifique à se pencher sur les facteurs exogènes et endogènes comme étiologies possibles de la maladie.

### **1.3 Étiologie**

Dans la plupart des cas, les patients SLA ne montrent pas d'historique familiale de la maladie et sont donc classés sous le terme de « cas sporadiques », représentant 90% des cas de SLA. Quand il existe des antécédents familiaux et qu'une mutation génétique est transmise, généralement de façon autosomique dominante, on parle de « cas familiaux ». Ces patients représentent 10% des cas de SLA (Andersen and Al-Chalabi, 2011). L'étiologie reste encore à l'heure actuelle grandement méconnue, mais il a été clairement établi que la SLA est une maladie multifactorielle et que des facteurs génétiques et environnementaux sont à l'origine de la pathologie (Al-Chalabi et al., 2016) (Figure 11).

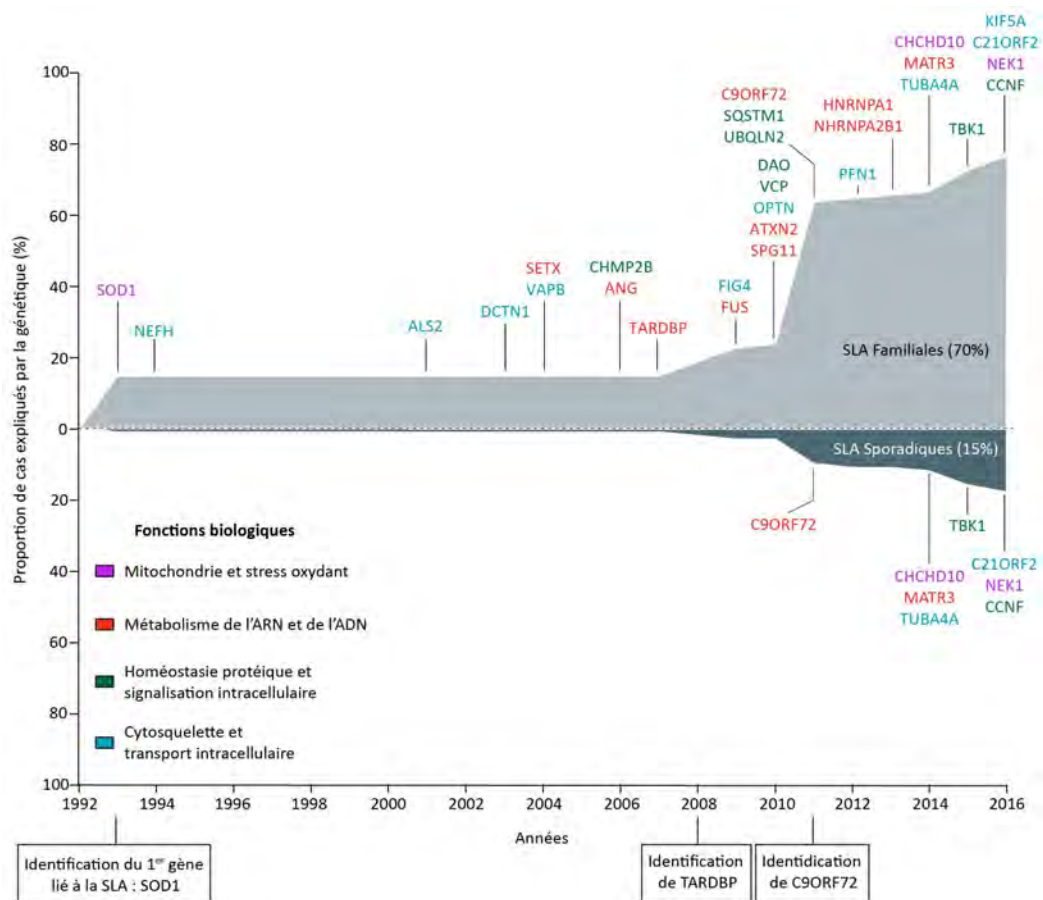
#### **1.3.1. Facteurs génétiques**

Les cas familiaux ont permis d'identifier des mutations génétiques causant la SLA, dont la première en 1993 sur le gène *SOD1*. Depuis, plus de 25 gènes mutés associés à la SLA ont été découverts. Parmi ces mutations, on retrouve des gènes qui causent directement la pathologie et des gènes qui prédisposent au développement de la SLA (Tableau 2 et figure 10)(Andersen and Al-Chalabi, 2011; Millecamps et al., 2012; Nguyen et al., 2018).

#### **Superoxyde dismutase 1 (SOD1)**

En 1993, la première mutation associée à des cas de SLA familiale est identifiée sur le gène codant pour la superoxyde dismutase 1 (Rosen et al., 1993). Les mutations *SOD1* représentent 15% des cas familiaux et environ 2% des cas sporadiques de SLA (Zou et al., 2017). Ce gène code pour une enzyme homodimérique ubiquitaire, la superoxyde dismutase 1, cytosolique à cuivre zinc. Cette enzyme joue un rôle essentiel dans l'équilibre oxydation/réduction car elle catalyse la réduction des anions superoxyde (espèces réactives de l'oxygène) en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme joue un rôle essentiel dans l'équilibre oxydation/réduction car elle catalyse la réduction des anions superoxyde (espèces réactives de l'oxygène) en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. Plus de 170 mutations *SOD1* ont été associées à la SLA, la plupart de ces modifications génétiques sont

des mutations de type faux sens et affectent le site actif de l'enzyme ou sa structure. Mais on retrouve également des mutations par délétion ou duplication (Andersen and Al-Chalabi, 2011).



**Figure 10 : Découverte des gènes associés à la SLA et implications physiopathologiques.** Les avancées de la génétique ont permis la découverte récente de nombreux gènes associés à la SLA. Ces gènes se regroupent en 4 catégories physiopathologiques : mitochondrie et stress oxydant ; métabolisme de l'ARN et de l'ADN, homéostasie protéique et signalisation intracellulaire ; cytosquelette et transport intracellulaire (Adaptation de (Chia et al., 2018)).

Les mécanismes par lesquels les mutations *SOD1* induisent leurs effets ne sont pas encore bien identifiés. Les études chez l'animal ont montré qu'il ne s'agit pas d'une perte de fonction mais davantage d'un gain de fonction toxique. Une des hypothèses actuelles serait une propagation de type prion de la protéine *SOD1* mutée (Ayers et al., 2016; Grad et al., 2017; Reaume et al., 1996). Au niveau cellulaire, les mutations *SOD1* induisent un stress oxydatif, la formation d'agrégats, des défauts mitochondriaux, un stress du réticulum endoplasmique, une hyperexcitabilité et un défaut du transport axonal (Hayashi et al., 2016).



### **TAR DNA-Binding Protein-43 (TARDBP) et Fused in Sarcoma (FUS)**

Les mutations des gènes *TARDBP*, qui encode la protéine TDP-43, et *FUS* ont respectivement été découvertes en 2008 et 2009 et représentées entre 3 et 5% des cas familiaux et environ 1% des cas sporadiques pour chaque gène (Kabashi et al., 2008; Kwiatkowski et al., 2009; Lattante et al., 2013; Vance et al., 2009). TDP-43 et FUS sont des protéines nucléaires ubiquitaires de liaison à l'ADN et à l'ARN. Elles jouent des rôles importants dans la transcription des gènes, l'épissage des ARN et la synthèse et le transport des ARN messagers. Normalement nucléaires, ces protéines se retrouvent dans le cytoplasme des neurones et forment des agrégats toxiques (Deng et al., 2014; Dormann et al., 2010; Lagier-Tourenne et al., 2012; Neumann et al., 2006).

Récemment au laboratoire, des résultats ont montré que la rétention cytoplasmique de la protéine FUS tronquée dans sa partie C-terminale conduit à la mort des MN, selon un mécanisme de gain de fonction toxique (Scekic-Zahirovic et al., 2016).

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

C'est seulement en 2011 que le gène *C9ORF72* a été associé à la SLA pour la première fois, alors qu'il s'agit du gène muté le plus fréquemment rencontré dans les formes familiales, 39% des cas, mais aussi dans les formes sporadiques, 7% des cas. Cette mutation est particulière par rapport aux autres car elle est le résultat d'une expansion de répétitions d'hexanucléotides 4G2C dans la partie non codante du gène (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Majounie et al., 2012; Renton et al., 2011). La fonction physiologique de la protéine codée par *C9ORF72* est pour l'heure encore énigmatique. Des études récentes ont montré son implication dans le transport d'endosomes (Farg et al., 2014), l'autophagie (Nassif et al., 2017) et les fonctions immunitaires et microgliales (Lall and Baloh, 2017; O'Rourke et al., 2016). Les mécanismes pathologiques sont tout autant débattus. Actuellement, trois hypothèses dominent les débats : 1) une haploinsuffisance causée par la diminution de l'expression de *C9ORF72* due aux répétitions ; 2) une séquestration, par les ARNm du mutant *C9ORF72*, de protéine de liaison à l'ARN (telles FUS ou TDP-43), induisant un métabolisme de l'ARN aberrant ; 3) une perturbation de l'homéostasie des protéines due à la production de protéines mutées contenant des répétitions dipeptidiques, induisant un défaut de l'autophagie et une accumulation toxique de protéines. Il est possible que ces trois mécanismes coexistent et qu'ils fonctionnent en synergie à différent stade de la pathologie

(Ash et al., 2013; Balendra and Isaacs, 2018; Ciura et al., 2013; Mori et al., 2013a; Shi et al., 2018; Tran et al., 2015; Walker et al., 2017).

### Les autres gènes

Les quatre gènes cités précédemment (*SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9ORF72*) représentent plus de 60% des cas familiaux de SLA. Mais de nombreuses autres mutations sont retrouvées dans différents gènes, avec des fréquences très faibles (Renton et al., 2014; Volk et al., 2018).

La liste de tous les gènes associés à la SLA est représentée dans le tableau 2. Le dernier gène à avoir été découvert est *Kinesin family member 5 (KIF5A)* en 2018 grâce à une étude collaborative internationale de grande envergure regroupant 250 chercheurs ayant comparés 20 806 patients SLA à 59 804 contrôles. Ce gène code pour une protéine neuronale impliquée dans le transport axonal (Brenner et al., 2018; Nicolas et al., 2018). Sa fréquence et ses mécanismes pathologiques ne sont pour l'heure pas encore connus.

Année	Gène	Locus	Effet génétique	Protéine	Fonctions
2018	KIF5A	12q13.3	AD - FR	Kinesin Family Member 5A	Protéine associée aux microtubules
2016	CCNF	16p13.3	AD		Homéostasie protéique
2016	NEK1	4q33	AD -AR	NIMA Related Kinase 1	Réparation de l'ADN, mitochondrie
2016	CFAP410 (C21ORF2)	21q22.3	AD - FR	Cilia and Flagella Associated Protein 410	Réparation de l'ADN et cytosquelette
2015	TBK1	12q14.2	AD - DN	TANK binding Kinase 1	Voie NFkB -Signalisation intracellulaire
2014	CHCHD10	22q11.23	AD	Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10	Protéine mitochondriale
2014	TUBA4A	2q35	AD	Tubuline alpha 4a	Protéine associée aux microtubules
2014	MATR3	5q31.2	AD	Matrine 3	Régulation de la transcription et stabilisation des ARN
2013	HNRNPA1	12q13.13	AD – FR - DN	Heterogenous nuclear Ribonucleoprotein A1	Protéine de liaison à l'ARN
2013	HNRNPA2B1	7p15.2	AD - FR	Heterogenous nuclear Ribonucleoprotein 2B1	Protéine de liaison à l'ARN
2012	PFN1	17p13.2	AD	Profilin 1	Régulation de la polymérisation de l'actine - Cytosquelette

2011	SQSTM1	5q35.3	AD	Sequestosome 1 (P62)	Signalisation intracellulaire et autophagie
2011	UBQLN2	Xp11.21	AD	Ubiquiline 2	Dégradation des protéines et autophagie
2011	C9ORF72	9p21.2	AD	Chromosome 9 Open Reading Frame 72	Régulation du trafic endosomal et métabolisme de l'ARN
2010	DAO	12q24	AD	D-amino acid oxydase	Transmission glutamatergique
2010	OPTN	10p13	AD - AR	Optineurin	Trafic membranaire
2010	SPG11	15q14	AR	Spatascin 11	Réparation de l'ADN
2010	VCP	9p13.3	AD - DN	Vasolin containing protein	Dégradation des protéines - Protéasome
2010	ATXN2	12q24.12	AD - FR	Ataxine 2	Régulation de la traduction
2010	SIGMAR1	9p13.3	AD - AR	Sigma Non-opioïd receptor 1	Récepteur - Signalisation intracellulaire
2009	FIG4	6q21	AD	Polyphosphoinositide phosphatase	Signalisation intracellulaire et transport endosomal
2009	FUS	16p11.2	AD – AR - DN	Fused in Sarcoma	Protéine de liaison à l'ARN
2008	TARDBP	1p36.22	AD – AR - DN	TAR DNA Binding Protein 43	Protéine de liaison à l'ARN
2006	CHMP2B	3p11.2	AD	Charged Multivesicular Body Protein 2B	Trafic endosomal et autophagie
2006	ANG	14q11.2	FR	Angiogénine	Ribonucléase
2004	VAPB	20q13.32	AD	VAMP Associated Protein B	Trafic vésiculaire
2004	SETX	9q34.13	AD	Senataxine	Hélicase ADN/ARN
2003	DCTN1	2p13.1	AD - FR	Dynactine 1	Trafic intracellulaire - Microtubules
2003	Inconnu	20p13	AD	Inconnu	Inconnu
2002	Inconnu	18q21	AD	Inconnu	Inconnu
2001	ALSIN	2q33.1	AR	Alsin	Trafic endosomal
1994	NEFH	22q12	AD - FR	Neurofilament Heavy	Cytosquelette et Transport axonal
1993	SOD1	21q22.1	AR – AD - DN	Superoxyde Dismutase 1	Stress oxydatif

**Tableau 2 : Principaux gènes découverts associés à la SLA.** Abréviations : AD : autosomal dominant ; AR : autosomal récessif ; DN : *de novo* ; FR : facteur de risque.

### **1.3.2. Facteurs environnementaux**

L'exposition à l'environnement semble être faiblement impliquée dans les causes de la maladie, elle serait plutôt cumulative au fil du temps (Figure 11). Aucune étude solide n'a pu prouver qu'il existe un facteur déclenchant de la maladie. L'exposome de chaque patient étant infini en temps et en espace, les études sur les facteurs environnementaux restent très difficiles à mettre en place. Jusqu'à présent, la recherche s'est effectuée de manière arbitraire mais cela a permis de dégager une liste de facteurs impliqués, de près ou de loin, dans le développement de la SLA (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Couratier et al., 2016; Eisen et al., 2014).

Plusieurs études se sont intéressées à divers métaux lourds (plomb, arsenic, sélénium, manganèse etc.), en raison des taux élevés retrouvés dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien des patients (Gresham et al., 1986; Sutedja et al., 2009). Un risque significativement accru de développer la SLA chez les hommes suite à l'exposition à des produits chimiques et des pesticides a été démontré par une étude récente (Malek et al., 2012). Certaines neurotoxines produites par des bactéries ont été clairement identifiées dans certains cas précis de SLA (Bradley and Mash, 2009) et la mise en cause de virus a aussi été envisagée lorsque l'on a retrouvé des transcrits et loci actifs d'origine virale chez certains patients (Celeste and Miller, 2018; Douville et al., 2011; Oluwole et al., 2007).

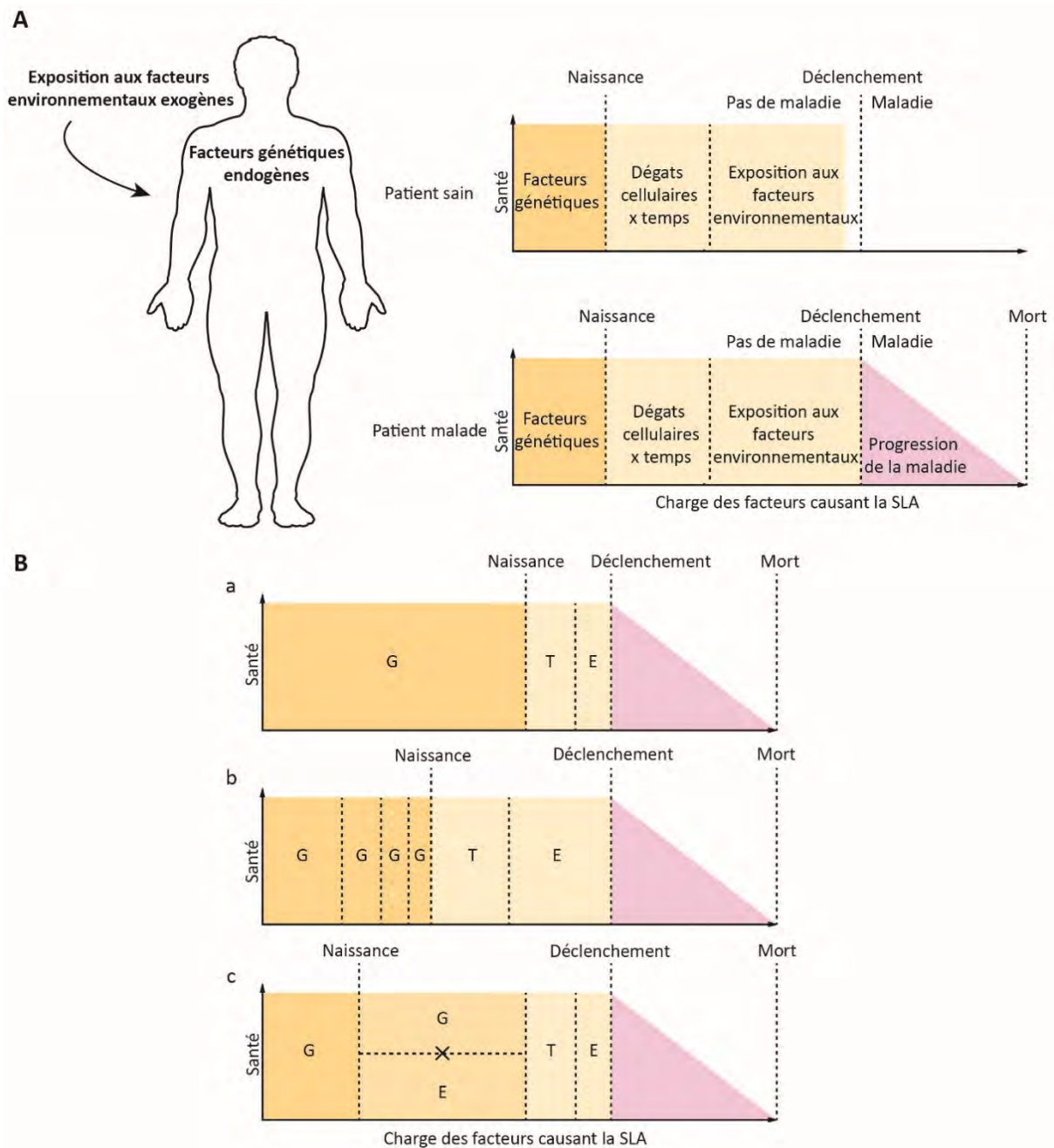
### **1.3.2. Autres facteurs de risques**

La SLA étant une maladie du système moteur adulte, le facteur de risque le mieux défini est l'âge puisque le risque de développer une SLA augmente avec l'âge et atteint un pic à 70 ans (Logroscino et al., 2015). L'observation et le questionnement des patients SLA ont suggéré que le mode de vie pourrait inclure de nombreux des facteurs de risque. En effet, les patients SLA sont souvent sportifs et minces et des études ont montré que l'activité physique et un faible indice de masse corporelle étaient des facteurs de risques (Huisman et al., 2013; O'Reilly et al., 2013; Scarmeas et al., 2002). De plus, une incidence beaucoup plus élevée a été constatée chez les joueurs de football professionnels italiens de Série A, B et C (Beretta et al., 2003). Mais dans ce cas-là, d'autres facteurs peuvent être confondus comme la prise de drogues, les pesticides ou encore les engrais utilisés sur les terrains etc. Les habitudes alimentaires des patients sont aussi suspectées, comme le montre la corrélation inverse entre un régime à forte teneur en antioxydant ou l'utilisation de vitamine E et un risque plus faible

de développer la SLA. D'autres études ont montré le rôle bénéfique des acides gras polyinsaturés (Fitzgerald et al., 2014; Pupillo et al., 2014a). Comme dans d'autres pathologies, le tabagisme aurait un effet sur le risque de développer la SLA, surtout chez les femmes. Cependant, plusieurs études se contredisent sur le rôle potentiellement positif ou négatif du tabac (Alonso et al., 2010; Armon, 2009; Fang et al., 2006).

### **1.3.3. Interactions des facteurs**

La SLA est une maladie complexe pouvant avoir une composante monogénique avec des variants rares possédant une grande pénétrance, une composante oligogénique avec des variants rares ayant une pénétrance intermédiaire, une composante multifactorielle avec des facteurs de risques communs et une interaction forte avec l'environnement et le temps. Pour essayer de comprendre les interactions qui régissent le déclenchement et la progression de la SLA, la figure 11 reprend le modèle Gène-Temps-Environnement (GTE) (Al-Chalabi and Hardiman, 2013). Ce modèle propose différents scénarios pouvant mener au déclenchement de la SLA en fonction de différentes interactions entre les gènes, les facteurs environnementaux et le temps.



**Figure 11 : Le modèle Gène-Temps-Environnement (GTE).** **A**) Un seuil de déclenchement de la maladie peut être déterminé par des facteurs génétiques (G), l'exposition aux facteurs environnementaux (E) et les dégâts cellulaires causés au cours du temps (T). Si l'individu dépasse ce seuil, alors la maladie se déclenche. **B**) a. Une mutation monogénique très pénétrante ayant un lourd impact avec une exposition à des facteurs environnementaux et un effet du temps. b. Plusieurs mutations se cumulant avec une exposition à des facteurs environnementaux et l'effet du temps. c. Une combinaison spécifique de mutations génétiques et de facteurs environnementaux déclenche la maladie (Adaptation de (Al Chalabi et al., 2013)).

## **1.4 Hétérogénéité des signes cliniques**

La SLA est une maladie complexe, multifactorielle, aux représentations phénotypiques très hétérogènes. Pour ces raisons, la SLA est parfois qualifiée de syndrome, c'est à dire un ensemble de symptômes fréquemment associés, plutôt que de maladie (Robberecht and Philips, 2013).

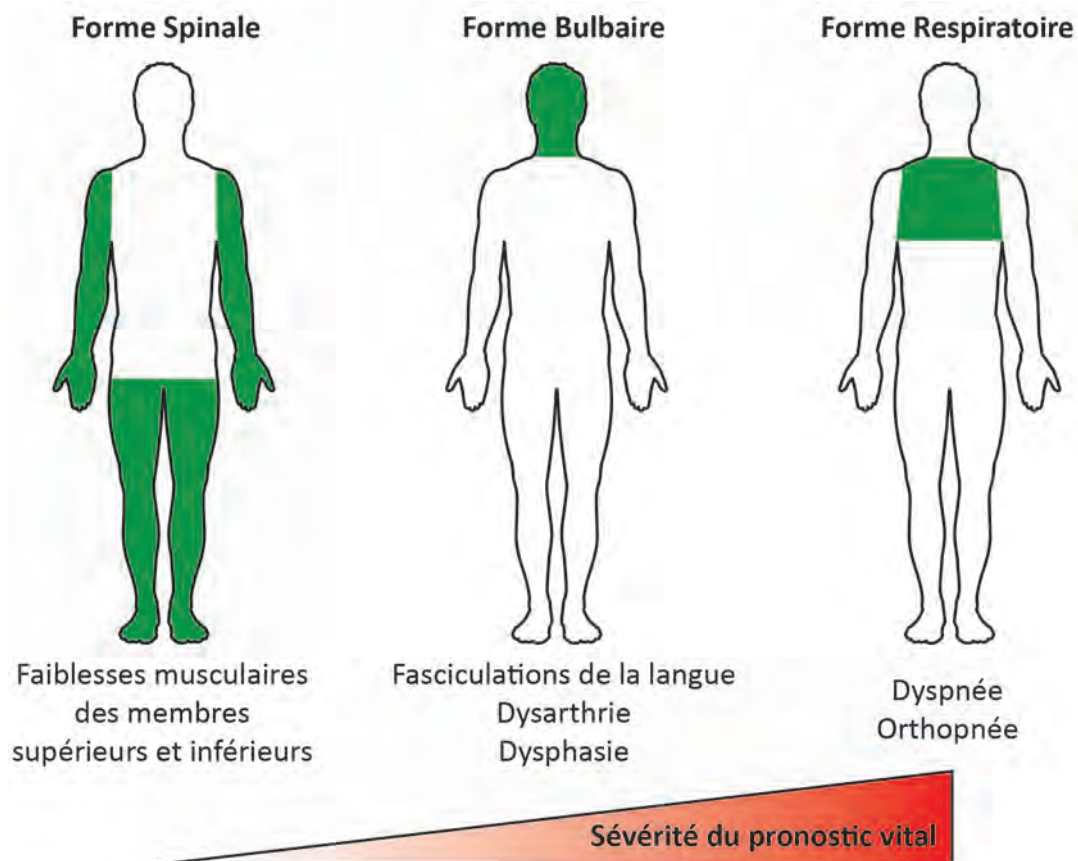
### **1.4.1. Diversité des symptômes**

Les symptômes liés à la dégénérescence des NCS sont une augmentation du tonus musculaire, de la spasticité et de l'hyperréflexie. L'atteinte des MN conduit quant à elle à des symptômes tels que les crampes et fasciculations, l'atrophie et la faiblesse musculaire, ainsi que la dysphasie (troubles du langage et de l'élocution) et la dysarthrie (troubles de l'articulation, de la mastication et de la déglutition) (Figure 9). Mais d'autres signes cliniques fréquents vont bien au-delà de cette définition initiale.

Une grande partie des patients SLA présentent des altérations du métabolisme énergétique (Dupuis et al., 2011; Vandoorne et al., 2018). En effet, les patients ont généralement un indice de masse corporelle (IMC) normal ou inférieur à la moyenne (O'Reilly et al., 2013). De plus, une forte corrélation négative existe puisque plus l'IMC est faible, plus la vitesse de progression de la maladie est élevée. Les patients perdent également du poids au cours de la maladie et cette perte est corrélée positivement à la sévérité (Park et al., 2015) et la progression de la pathologie (Desport et al., 1999; Dupuis et al., 2011). Des analyses rétrospectives suggèrent que des années avant l'apparition de la maladie, les patients subiraient une importante perte de poids (Peter et al., 2017). Environ 50 à 60% des patients présentent des défauts dans la balance énergétique. Ils consomment plus d'énergie au repos, ils sont hypermétaboliques (Bouteloup et al., 2009; Desport et al., 2001; Dupuis et al., 2011; Funalot et al., 2009; Vaisman et al., 2009). On note que 50% des patients ont une hyperlipidémie (Dedic et al., 2012; Dupuis et al., 2008) et une intolérance au glucose avec ou sans résistance au glucose (Dupuis et al., 2011; Pradat et al., 2010).

On peut également retrouver de nombreux troubles cognitifs, émotionnels et dépressifs (Jelsone-Swain et al., 2012; Rabkin et al., 2015). 50% des patients SLA présentent des troubles cognitifs et comportementaux associés à des changements dans les lobes frontotemporaux et une dégénérescence neuronale corticale. De plus, 15% des patients SLA

développent au fil du temps une démence frontotemporale (DFT) et inversement (Al-Chalabi et al., 2016; Ling et al., 2013; Phukan et al., 2012). La DFT est une maladie neurodégénérative conduisant à une perte neuronale dans les lobes frontotemporaux induisant des changements comportementaux, des troubles de la personnalité et des atteintes du langage (Van Langenhove et al., 2012). Il est maintenant bien établi qu'il existe un continuum entre la SLA et la DFT dont chacune des formes pures, respectivement sans symptômes cognitifs et sans symptômes moteurs, représentent des extrêmes. Le pronostic des patients avec de faibles troubles cognitifs est semblable aux patients SLA classiques. En revanche, les patients SLA développant une DFT ont un pronostic plus défavorable (Swinnen and Robberecht, 2014).



**Figure 12 : Les différents sites d'apparition de la SLA.** La SLA peut se déclencher dans trois zones différentes du corps. Lorsque le déclenchement a lieu dans les membres supérieurs ou inférieurs, on parle de forme spinale. Dans les formes bulbaires, ce sont les motoneurones bulbaires qui sont touchés en premier. Enfin, dans la forme respiratoire, les muscles thoraciques sont affectés les premiers. La sévérité du pronostic vital est dépendante du site d'apparition de la maladie. La forme respiratoire ayant le moins bon pronostic.



### **1.4.2. Différents sites d'apparition**

Dans environ 75% des cas, la maladie débute dans un membre supérieur ou inférieur, de manière asymétrique, commençant plus souvent dans la partie distale plutôt que proximale d'un membre. On parle alors de forme spinale de la SLA qui est connue pour avoir la progression la moins sévère (Chio et al., 2011; Swinnen and Robberecht, 2014). Dans la forme bulbaire, qui concerne 20% des cas, le pronostic vital est lui plus engagé car les symptômes démarrent au niveau des muscles de la face, du pharynx, du larynx et de la langue, conduisant à des problèmes de déglutition et de respiration. (Turner et al., 2010b). Enfin, la forme respiratoire est présentée comme la plus sévère et concerne environ 5% des cas. Elle conduit à de grandes difficultés respiratoires entraînant le décès rapide des patients (Shoesmith et al., 2007). Il existe donc une corrélation entre le site d'apparition, la progression et la durée de la maladie chez les patients SLA (Robberecht and Philips, 2013; Swinnen and Robberecht, 2014) (Figure 12).

### **1.4.3. Différents âges de déclenchement**

La moyenne d'âge d'apparition de la SLA se situe entre 50 et 60 ans. Cependant, des SLA ont déjà été déclarées chez des patients de moins de 20 ans et de plus de 80 ans. On définit la SLA comme étant juvénile lorsque les premiers symptômes apparaissent avant l'âge de 25 ans. Ces formes juvéniles sont causées par des mutations spécifiques dans les gènes *FUS*, *ALS2* et *SETX*. Généralement, ces patients ont une évolution plus lente (Pupillo et al., 2014b; Sabatelli et al., 2008). Quand la maladie se déclare entre 20 et 40 ans, les patients ont une probabilité plus forte de développer une forme affectant de manière prédominante les NCS, ils auront également moins de chance de développer une forme bulbaire (Sabatelli et al., 2008; Swinnen and Robberecht, 2014). Au contraire, quand la maladie se déclare après 80 ans, la progression est plus rapide et les patients développent généralement une forme bulbaire, et les signes cliniques de l'altération des NCS sont moindres (Forbes et al., 2004; Zoccollella et al., 2008). Il existe donc une corrélation entre l'âge d'apparition et la durée de la maladie (Eisen et al., 1993; Pupillo et al., 2014b; Swinnen and Robberecht, 2014).

	<b>Critères d' El Escorial (1994)</b>	<b>Critères d' Airile House (2000)</b>	<b>Critères d' Awaji-Shima (2008)</b>
<b>SLA suspectée</b>	Signes de l' atteinte des MN uniquement	-	-
<b>SLA Possible</b>	Signes de l' atteinte des NCS et des MN dans une seule région, ou signes de l' atteinte des NCS seuls dans deux ou plusieurs régions, ou signes de l' atteinte des MN sur une région rostrale aux signes des NCS	Signes de l' atteinte des NCS et des MN dans une seule région, ou signes de l' atteinte des NCS seuls dans deux ou plusieurs régions, ou signes de l' atteinte des MN sur une région rostrale aux signes des NCS	Preuves cliniques ou électrophysiologiques de l' atteinte des NCS et des MN dans une seule région, ou signes de l' atteinte des NCS seuls dans deux ou plusieurs régions ou signes de l' atteinte des MN sur une région rostrale aux signes des NCS
<b>SLA probable avec preuves paracliniques</b>	-	Preuves cliniques de l' atteinte des NCS et des MN dans une seule région, ou des signes de l' atteinte des NCS seuls dans une région et des preuves électrophysiologiques de l' atteintes des MN dans au moins deux régions	-
<b>SLA cliniquement probable</b>	Signes de l' atteinte des NCS et des MN dans au moins deux régions, avec des signes des NCS sur une région rostrale aux signes MN	Signes de l' atteinte des NCS et des MN dans au moins deux régions, avec des signes des NCS sur une région rostrale aux signes MN	Preuves cliniques ou électrophysiologiques de l' atteinte des NCS et des MN dans au moins deux régions, avec des signes des NCS sur une région rostrale aux signes MN
<b>Diagnostic SLA définitif</b>	Signes de l' atteintes des NCS et des MN dans trois régions	Signes de l' atteinte des NCS et des MN dans la région bulbaire et dans au moins deux régions spinales et des signes de l' atteinte des MN dans trois régions spinales	Preuves cliniques ou électrophysiologiques de l' atteinte des NCS et des MN dans la région bulbaire et au moins deux régions spinales, ou signes de l' atteinte des NCS et des MN dans trois régions spinales

**Tableau 3 : Le diagnostic de la SLA selon les critères d'El Escorial et ses révisions.**

Abréviations : MN : motoneurones ; NCS : neurones corticospinaux.

## **1.5 Diagnostic et méthodes d'évaluation**

L'hétérogénéité clinique que présente les patients, la variabilité de la vitesse de progression et le fait que plusieurs autres maladies du motoneurone peuvent être confondues avec la SLA, rendent le diagnostic difficile à poser. Il n'existe à l'heure actuelle aucun test diagnostic définitif de la SLA. Pour l'instant le diagnostic reste différentiel et peut demander plus d'un an pour être clairement établi, afin de prendre en compte le caractère évolutif de la maladie (Paganoni et al., 2014; van Es et al., 2017).

### **1.5.1. Les critères de diagnostic**

Une SLA est diagnostiquée quand sont observés simultanément les signes de dégénérescence des NCS et des MN, qu'il y a une progression des atteintes tout en ayant exclu les autres maladies pouvant correspondre aux symptômes observés (van Es et al., 2017). L'approche la plus fréquemment utilisée pour établir le diagnostic de la SLA est l'utilisation des critères d'El Escorial, basés sur une évaluation clinique (Brooks, 1994; Brooks et al., 2000; Ludolph et al., 2015), et des critères d'Awaji qui rajoutent une composante neurophysiologique au diagnostic (Carvalho and Swash, 2009; de Carvalho et al., 2008; Geevasinga et al., 2016c). Ces critères reconnaissent quatre régions ou segments affectés par la SLA : bulbaire, cervical, thoracique et lombosacré. Les patients sont ensuite classés dans quatre catégories selon le degré de certitude du diagnostic. Le diagnostic SLA peut alors être possible, probable avec confirmation en laboratoire, probable ou certain (Tableau 3).

### **1.5.2. Méthodes d'évaluation**

L'établissement du diagnostic souffre d'un terrible manque de biomarqueur sensible et spécifique (Turner and Benatar, 2015; Turner et al., 2009). Les méthodes d'évaluation restent pour l'heure basées sur l'utilisation de l'électrophysiologie, de la neuroimagerie, de biopsies musculaires et bien évidemment, pour les cas familiaux, de génotypage.

La neuro-imagerie permet d'exclure d'autres maladies et de rechercher des signes typiques de l'atteinte des NCS et des MN d'un point de vue structurel et fonctionnel (Pradat and El Mendili, 2014; Verstraete et al., 2012). Les atteintes cognitives peuvent être reliées aux atrophies des lobes frontaux et temporaux par de l'imagerie cérébrale dans le cas où les patients SLA développent une DFT (Agosta et al., 2010; Mezzapesa et al., 2013; Verstraete et

al., 2012). La technique de stimulation magnétique transcrânienne (SMT) permet, de manière non-invasive, de tester le fonctionnement des NCS chez l'homme (Menon et al., 2015; Vucic and Rutkove, 2018).

Les symptômes liés à la dégénérescence des MN peuvent être confirmés par des analyses en électromyographie (EMG) (Daube, 2000; Joyce and Carter, 2013; Vucic and Rutkove, 2018). L'EMG de détection permet d'évaluer l'activité électrique des MN et des muscles et ainsi de renseigner leur état fonctionnel et d'innervation. Cette technique détecte les fibrillations et les fasciculations musculaires traduisant la dénervation et la dégénérescence des MN (de Carvalho et al., 2008; Joyce and Carter, 2013; Krarup, 2011). L'EMG de stimulodétection permet d'évaluer la conduction nerveuse et donc l'état des nerfs. Ce paramètre est important car il permet d'exclure les maladies neuropathiques qui affectent les nerfs sensoriels (de Carvalho et al., 2008; de Carvalho and Swash, 2000; Mills and Nithi, 1998; Pugdahl et al., 2008).

Dans le but de confirmer le diagnostic SLA et d'exclure d'autres maladies affectant le muscle, une biopsie musculaire peut être pratiquée sur les patients. L'examen histologique de la biopsie pourra alors permettre l'identification de signes d'atrophie, de dénervation et de nécrose de fibres musculaires (Jokela et al., 2016). Plusieurs prélèvements sanguins et du liquide céphalorachidien peuvent permettre la détection de changements de concentration de certaines molécules, pouvant faire suspecter une SLA mais ne faisant pas office de biomarqueurs spécifiques et sensibles de la maladie. Ces prélèvements permettent également de faire des tests génétiques pour éventuellement mettre en lumière une mutation génétique impliquée dans la SLA et ainsi confirmer le diagnostic (Vajda et al., 2017).

### **1.5.3. Évaluation de la progression de la SLA**

Bien que la progression de la maladie soit très hétérogène, il est important de pouvoir la prédire et l'évaluer afin d'adapter la prise en charge des patients et éventuellement leur inclusion possible dans des essais cliniques.

Pour évaluer l'état du patient, il existe une échelle, appelée score ALSFRS pour Amyotrophic Lateral Sclerosis Functionnal Rating Scale, qui mesure ses capacités physiques. C'est un questionnaire que le patient réalise en autonomie et a pour but d'analyser quatre catégories : les mouvements fins, les mouvements grossiers, les troubles bulbaires et les capacités respiratoires. A chaque question, cinq réponses sont possibles. 0 correspond à

l'impossibilité de réaliser la tâche demandée et 4 correspond au fonctionnement normal. Les points de l'ensemble des questions sont totalisés et donnent alors le score ALSFRS (Cedarbaum and Stambler, 1997; Cedarbaum et al., 1999). La réduction des capacités physiques et donc la diminution du score ALSFRS ainsi que la vitesse du déclin sont utilisés comme marqueurs de la sévérité de la maladie et de sa progression. La vitesse du déclin du score est connue pour être un bon indicateur pronostic (Elamin et al., 2015; Kaufmann et al., 2005; Kimura et al., 2006; Labra et al., 2016).

Plusieurs signes cliniques peuvent être de bons indicateurs de la progression de la maladie. Il existe une forte corrélation entre l'âge d'apparition de la maladie et la survie des patients. En effet, plusieurs études ont montré que plus la SLA survient tardivement, plus la survie est faible (Moura et al., 2015; Norris et al., 1993; Santos et al., 2018; Tanaka et al., 2012). Les formes bulbaires ont généralement un moins bon pronostic que les formes spinales de la SLA (del Aguila et al., 2003; Moura et al., 2015). Généralement, la cause finale de la mort des patients est l'arrêt respiratoire. Ainsi, le statut respiratoire des patients joue un rôle essentiel dans l'évaluation du pronostic vital (Bourke et al., 2006; de Carvalho et al., 1996; Gautier et al., 2010; Shoesmith et al., 2007). Compte tenu des troubles métaboliques observés chez les patients SLA, il a été montré qu'un indice de masse corporelle (IMC) inférieur à 25kg/m<sup>2</sup> est indicateur d'un mauvais pronostic (Desport et al., 2001; Moura et al., 2015; Peter et al., 2017; Shimizu et al., 2012).

## **2. Modélisation de la SLA**

Un modèle est une préparation expérimentale simplifiée présentant des similitudes à un processus biologique qu'on ne peut pas directement étudier chez l'Homme mais que l'on peut étudier dans des conditions contrôlées en laboratoire. Pour comprendre la pathologie de la SLA, trouver son étiologie et développer de nouvelles thérapies, il est important d'avoir accès à de bons modèles, qu'ils soient animaux, cellulaires ou bio-informatiques.

### **2.1 Modèles murins *Sod1***

La découverte de 11 mutations sur le gène codant pour l'enzyme SOD1 chez 13 cas de SLA familiales en 1993 (Rosen et al., 1993) a été le point de départ de la création des modèles animaux murins de la SLA (Turner and Talbot, 2008). Un an après cette découverte, la

première lignée murine transgénique modélisant la pathologie fut créée, ce sont les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Gurney et al., 1994). Actuellement, il existe plus d'une dizaine de modèles murins se basant sur des mutations du gène *Sod1* (Philips and Rothstein, 2015).

Les mécanismes des effets causés par les mutations dans le gène *Sod1* sont encore débattus. Cependant, l'hypothèse prédominante est qu'une mutation *Sod1* induit un gain de fonction toxique. En effet, le Knock-Out (KO) *Sod1* n'a pas de phénotype moteur mais représenterait plutôt un modèle de stress oxydatif (Reaume et al., 1996). Ces souris présentent une réduction de 30% de leur espérance de vie, une atrophie musculaire avec une faiblesse et une dénervation (Fischer et al., 2012; Flood et al., 1999; Muller et al., 2006). En revanche aucune perte des NCS et des MN n'a pu être constatée. L'hypothèse d'une perte de fonction n'est donc pas valable, même s'il semble y avoir une petite contribution (Shefner et al., 1999). Il apparaît clair que les mutations *Sod1* ne causent pas de perte d'activité et même que certaines ont une augmentation de leur activité (Borchelt et al., 1994). Les mécanismes pathologiques passeraient donc par un gain de fonction toxique (Joyce et al., 2011; Philips and Rothstein, 2015).

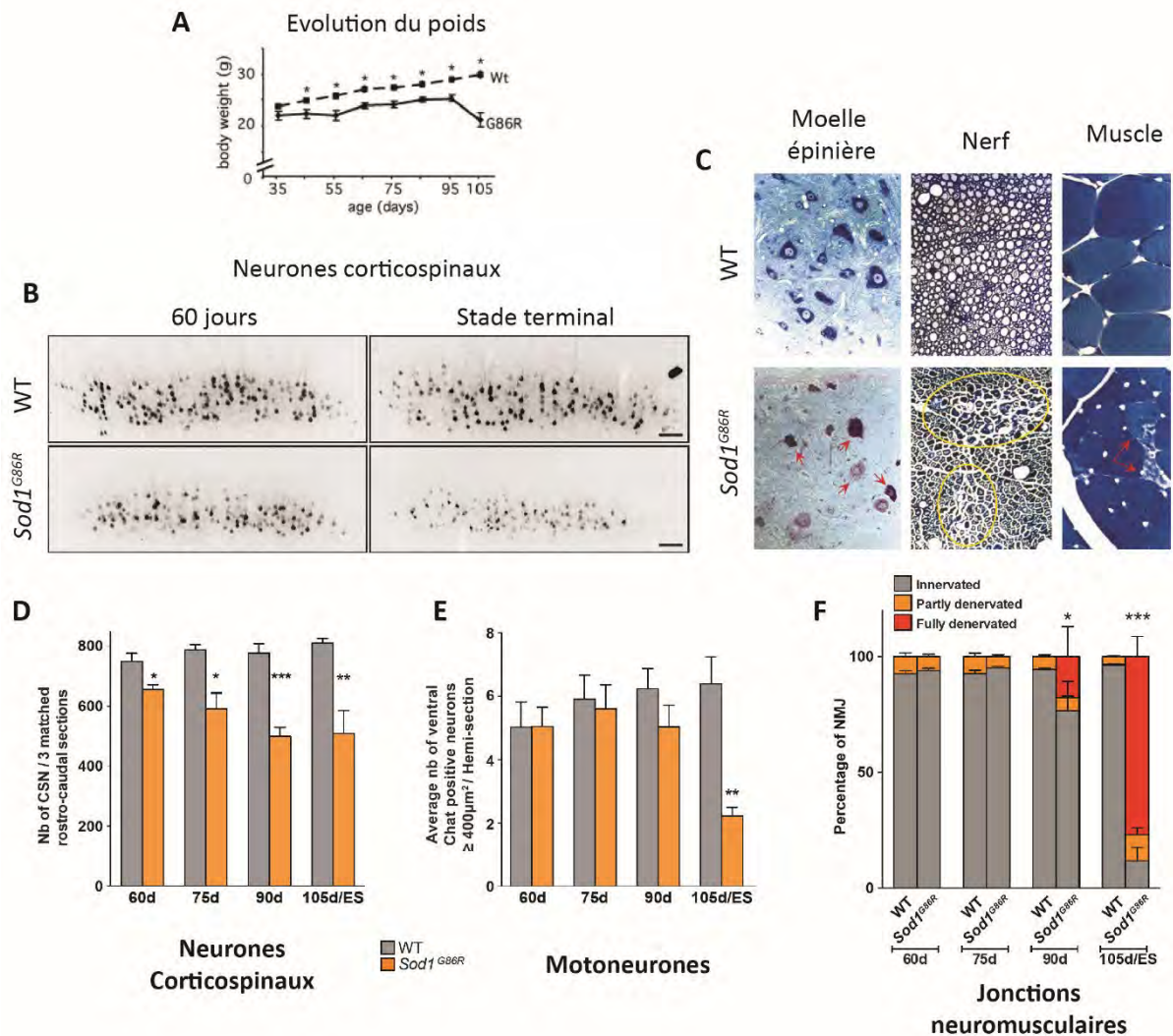
Mutation	Promoteur	Taux de sur-expression	Activité enzymatique	Début de la maladie (mois)	Survie (mois)	Perte des NCS	Perte des MN	Référence
G93A	Sod1 Humain	17	13	3	4	OUI	OUI	Gurney <i>et al.</i> , 1994
G37R	Sod1 Humain	4 – 12	5 – 14	3,5 – 6	7	OUI	NE	Wong <i>et al.</i> , 1995
G85R	Sod1 Humain	0.2 – 1	0	8	8,5	OUI	NE	Brujin <i>et al.</i> , 1997
G86R	Sod1 Murin	Faible à élevé	0	3 – 4	4	OUI	OUI	Ripps <i>et al.</i> , 1995

**Tableau 4 : Principaux modèles murins SOD1.** MN : motoneurones ; NCS : neurones corticospinaux.

La plupart de modèles *Sod1* surexpriment un mutant de l'enzyme. Cela comprend des mutations faux-sens ou des versions tronquées de la protéine. Parmi les lignées transgéniques *Sod1* les plus utilisées, certaines surexpriment le gène humain muté sous le contrôle du

promoteur *SOD1* humain avec tous ses éléments régulateurs, à des taux similaires (Lignée *SOD1<sup>G85R</sup>*) (Bruijn et al., 1997) ou à des niveaux très élevés (Lignée *SOD1<sup>G93A</sup>* ; *SOD1<sup>G37R</sup>*) (Gurney et al., 1994; Wong et al., 1995) comparé aux niveaux endogènes du gène murin. Ces modèles ont une forte augmentation de l'activité dismutase de l'enzyme. Au contraire, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* surexpriment une forme murine inactive de la *Sod1* sous contrôle du promoteur endogène murin (Ripps et al., 1995) (Figure 13). Chaque lignée diffère dans le déclenchement, les signes cliniques, la vitesse de progression de la maladie et la durée de vie (Tableau 4). Ils partagent généralement une perte de poids présymptomatique, une perte conjointe des NCS et des MN, une dénervation massive engendrant une paralysie progressive, et des agrégats protéiques neuronaux (Philips and Rothstein, 2015). Bien souvent, la surexpression à de hauts niveaux induit une accélération et une aggravation du phénotype. L'une des limites de ces modèles est le développement d'artéfacts de transgénèse. La simple surexpression du gène humain *WT* de la *Sod1* chez la souris n'induit pas non plus de phénotype moteur. Cependant, cette surexpression engendre une axonopathie, une vacuolisation des cellules de la moelle épinière et une perte des MN (Dal Canto and Gurney, 1995; Graffmo et al., 2013; Jaarsma et al., 2000).

Le modèle *SOD1<sup>G93A</sup>*, le premier créé, reste toujours le plus utilisé à ce jour (Gurney et al., 1994). Ces souris développent rapidement une neurodégénérescence qui se traduit par des tremblements et une faiblesse musculaire dès l'âge de 3 mois. S'en suit une paralysie progressive et une mort entre 4 et 5 mois. Les travaux de cette thèse portent sur un autre modèle murin, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (Ripps et al., 1995). Ce choix s'explique par plusieurs raisons scientifiques : 1) les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* portent un nombre élevé de copie du gène *Sod1* murin muté en position 86 (remplacement d'une Glycine par une Arginine), qui mime la mutation retrouvée chez le patient en position 85. Surexprimer un gène murin permet de s'affranchir de la toxicité de la surexpression d'un gène humain qui est retrouvé chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* ; 2) la mutation G86R abolit l'activité enzymatique de la protéine SOD1 et permet de s'affranchir de la toxicité qu'elle engendre, comme cela a été démontré par la surexpression de la forme sauvage du gène *SOD1* ; 3) les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* permettent l'utilisation de souris sauvages en contrôle unique tandis que pour les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, il faut utiliser des contrôles sauvages plus des contrôles surexprimant, à des taux similaires, la forme non mutée de la protéine humaine.



**Figure 13 : Le modèle murin Sod1<sup>G86R</sup> récapitule la perte des neurones corticospinaux (NCS) et des motoneurones (MN).** **A)** La perte de poids précède les symptômes moteurs chez les souris Sod1<sup>G86R</sup>. **B, D)** Le marquage rétrograde des NCS à partir des segments lombaires de la moelle épinière permet de mettre en évidence une perte précoce des NCS, dès 60 jours. **C, E)** Le comptage des MN spinaux montre que leur dégénérescence est un processus tardif, intervenant à 105 jours. **C, F)** L'étude du nerf sciatique indique une dégénérescence Wallérienne des axones myélinisés. La quantification de l'innervation des fibres musculaires et de l'atrophie du tibialis antérieur indique que ces altérations interviennent à 90 jours et précèdent la perte des MN. (Résultats tirés de : (Dupuis et al., 2000, 2004; Marques et al., 2019)).

Chez les souris Sod1<sup>G86R</sup>, le premier symptôme annonciateur du début de la maladie est la perte de poids, débutant à 75 jours (Dupuis et al., 2004). Les premiers symptômes



moteurs sont visibles entre 80 et 90 jours, cela se traduit par une altération du réflexe d'extension des pattes lorsque la souris est tenue par la queue dans le vide. A 90 jours, c'est le début de la dénervation visible en électromyogramme, il n'y a pas encore de perte des MN. La progression de la maladie est ensuite très rapide. La paralysie débute généralement dans les membres postérieurs à partir de 95 jours et la mort des animaux se situe entre 105 et 120 jours (Dupuis et al., 2000; Halter et al., 2010; Ripps et al., 1995). La mort des NCS récemment démontrée au laboratoire est un phénomène qui intervient très tôt dans le développement de la maladie puisque les premiers NCS meurent à des stades présymptomatiques à 60 jours (Marques et al., 2019b). Ce modèle se caractérise également par une forte altération du métabolisme énergétique (Dupuis et al., 2003; Henriques et al., 2015; Palamiuc et al., 2015), ainsi qu'une forte réaction astrocytaire et microgliale (El Oussini et al., 2016; Morrison et al., 1998) (Figure 13).

## **2.2 Autres modèles murins**

Bien que les modèles *Sod1* récapitulent les principales altérations retrouvées chez les patients, ils ne peuvent pas représenter l'ensemble des patients SLA. Avec les dernières découvertes en génétique, de nouveaux modèles ont été créés. Il existe maintenant plus de 30 lignées avec des mutations dans le gène *FUS* ou *TARDBP* et d'autres mutations ont aussi été modélisées comme *UBQLN2*, *VAPB*, *VCP* et récemment *C9ORF72* (De Giorgio et al., 2019).

### **2.2.1. Modèles *FUS* et *TDP-43/TARDBP***

La découverte que la majorité des patients SLA ont des inclusions TDP-43 aussi bien dans les formes familiales que les formes sporadiques et la découverte de mutations de gènes impliqués dans le métabolisme de l'ARN comme *TARDBP* et *FUS* ont suscité beaucoup d'intérêt (Lagier-Tourenne et al., 2010; Lutz, 2018; Neumann et al., 2006). Les modèles knock-out (KO) de ces deux protéines de liaison à l'ARN ont permis de fournir de précieuses informations sur les mécanismes de perte de fonction. En effet, chez les patients SLA, ces deux protéines normalement nucléaires se retrouvent dans le cytoplasme. Le KO homozygote de TDP-43 n'est pas viable. En revanche, l'hétérozygote est viable et développe des troubles moteurs tardifs et légers (Kraemer et al., 2010). Le KO conditionnel montre une dégénérescence des MN à l'âge adulte. La perte de fonction de TDP-43 est donc capable

d'induire une neurodégénérescence mais ne suffit pas à provoquer une SLA (Kraemer et al., 2010). Le KO de *FUS* conduit à une mort périnatale des souris homozygotes (Hicks et al., 2000). Dans un autre KO, viable grâce à l'introduction d'un fond génétique mixte, les souris présentent une perte de poids mais pas de phénotype moteur (Kino et al., 2015). La perte de *FUS* n'induit donc pas de pathologie SLA. De nombreuses lignées transgéniques ont été générées et surexpriment les protéines humaines sauvages ou mutées sous différents promoteurs. La surexpression de la forme humaine sauvage de *TDP-43* induit des phénotypes moteurs sévères et précoces, avec une perte des MN, des agrégats protéiques, une perte de poids et une espérance de vie fortement réduite selon les modèles (Stallings et al., 2010; Wils et al., 2010; Xu et al., 2010). Pour *FUS*, la surexpression de sa forme humaine sauvage, entraîne un phénotype tout aussi sévère, voir plus que l'expression des formes mutées (Mitchell et al., 2013; Sephton et al., 2014). Ces modèles nous montrent que les niveaux de surexpression jouent un rôle important dans le développement de la pathologie et qu'il est important d'en tenir compte. Cela vient des mécanismes de boucles d'autorégulation que ces protéines mettent en place pour contrôler leurs propres expressions. Ces taux d'expression peuvent rapidement atteindre des niveaux toxiques (De Giorgio et al., 2019). La surexpression des mutants de *TDP-43* induit des phénotypes sévères et létaux, avec certains artefacts de transgénése pour quelques modèles. En revanche, chez les mutants avec des taux d'expression proche des niveaux endogènes, le développement du phénotype moteur reste modeste, avec une perte des MN, une dénervation mais pas de paralysie ni de réduction de l'espérance de vie (Arnold et al., 2013; Janssens et al., 2013; Mitchell et al., 2015; Swarup et al., 2011). La surexpression des mutants de *FUS* est très toxique et donne lieu à des phénotypes sévères (Qiu et al., 2014; Sephton et al., 2014; Shelkownikova et al., 2013). Le développement d'animaux Knock-In (KI) permet de s'affranchir de la toxicité liée à la surexpression. Ces animaux développent progressivement une neurodégénérescence avec un phénotype moteur modeste, sans paralysie létale (Devoy et al., 2017; Scekcic-Zahirovic et al., 2017; Scekcic-Zahirovic et al., 2016).

### **2.2.2. Modèles C9ORF72 et autres gènes**

D'autres gènes, moins fréquemment mutés dans la SLA, ont été utilisés pour modéliser la pathologie. C'est le cas par exemple : *CHCHD10*, *KIF5A*, *PFN1*, *OPTN*, *TBK1*, *UBQLN2*, *VAPB*, ou encore de *VCP*, parmi d'autres. Il est intéressant de préciser que des phénotypes de

paralysie progressive avec une perte des MN se retrouvent seulement dans les modèles de souris transgéniques *UBQLN2* (Le et al., 2016) et *PFN1* (Fil et al., 2017; Yang et al., 2016). La découverte que la mutation *C9ORF72* est présente chez approximativement 40% des cas familiaux de SLA a suscité beaucoup d'intérêt au sein de la communauté scientifique. Le KO du gène *C9ORF72* ne développe pas de neurodégénérescence. En revanche, il présente une splénomégalie et une lymphadénopathie, avec des atteintes des cellules du système immunitaire (Atanasio et al., 2016; Burberry et al., 2016; Koppers et al., 2015; O'Rourke et al., 2016). Plusieurs groupes ont ensuite générés des mutants récapitulant les répétitions de CAG dans des chromosomes bactériens artificiels (Chew et al., 2015; Jiang et al., 2016; Liu et al., 2016; O'Rourke et al., 2016; Peters et al., 2015). Il existe plusieurs différences entre ces modèles et la pénétrance est incomplète. Certains arrivent à développer des aspects de la pathologie comme la perte de neurones corticaux et spinaux induisant des déficits moteurs et une paralysie progressive (Batra and Lee, 2017).

Malgré les avancés de la manipulation du génome, la création de modèles murins repose encore beaucoup sur la surexpression de gènes mutés pour obtenir un phénotype suffisamment marqué durant la vie des animaux (Lutz, 2018). Mais le développement de techniques comme CRISPR/Cas9 va permettre de créer dans les années à venir de meilleurs modèles animaux. Aucun modèle murin n'est parfait, mais la collecte d'informations provenant de différents modèles nous permettra de mieux comprendre la maladie.

## **2.3 Modèles cellulaires**

La SLA étant une maladie multicellulaire, plusieurs des types cellulaires affectés peuvent être cultivés et servir de modèles simplifiés (Veyrat-Durebex et al., 2014).

### **2.3.1. Lignées cellulaires et cultures primaires**

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées pour leur ressemblance aux MN. C'est notamment le cas de la lignée SH-SY5Y, pour lesquelles les auteurs ont surexprimé le gène muté *SOD1* (Jaiswal et al., 2009), des cellules PC12, utilisées pour étudier les agrégats *SOD1* (Matsumoto et al., 2005) et les cellules NSC-34 qui sont capables de former des synapses cholinergiques en co-culture avec des myotubes. Cette dernière est considérée comme étant

la lignée la plus stable et la plus physiologique, elle reste par conséquent la plus utilisée (Barber et al., 2009; Prause et al., 2013). Des cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires et de MN spinaux ont également été développées pour contrecarrer les artefacts des lignées immortalisées (Boutahar et al., 2011; Caioli et al., 2011; Majumder et al., 2012). Pour les cellules gliales, des lignées cellulaires telles que U87MG ont été utilisées (Caragounis et al., 2010), mais ce sont surtout les cultures primaires qui ont été étudiées pour comprendre la neuroinflammation et les interactions avec les neurones (Gandelman et al., 2010; Hensley et al., 2006; Sargsyan et al., 2009). Enfin, des cultures de cellules musculaires ont été obtenues suite à des biopsies chez des patients SLA, notamment dans le but de trouver de nouveaux biomarqueurs (Guo et al., 2011; Palma et al., 2011). La lignée C2C12 est d'ailleurs très largement utilisée pour étudier le muscle dans la SLA (Onesto et al., 2011). Les lignées cellulaires sont simples d'utilisation et supportent bien l'introduction d'un gène muté. Cependant, le processus d'immortalisation change fortement leur statut physiologique d'origine. Pour cela, les cultures primaires sont plus proches des conditions physiologiques.

La principale limite de la plupart des modèles *in vitro* dans la SLA est l'utilisation trop importante de monocultures. Elles ont permis la découverte de plusieurs mécanismes pathologiques mais la SLA est une maladie impliquant une interaction importante entre plusieurs types cellulaires, le tout dans un environnement inflammatoire et neurodégénératif. Les co-cultures et les cultures en 3 dimensions vont être très importantes à l'avenir.

### **2.3.2. Cellules souches pluripotentes induites**

La possibilité de créer des cellules souches pluripotentes induites (CSPi) à partir de cellules différenciées provenant de patients permet pour la première fois d'étudier aussi bien les formes familiales et sporadiques de la SLA (Fujimori et al., 2018; Van Damme et al., 2017). Ces modèles sont importants car ils permettent de s'affranchir de la surexpression des transgènes contenant les mutations. En plus de contenir les mutations des patients, ces cellules contiennent tout le fond génétique.

Les CSPi peuvent en théorie générer tout type de neurones. Il existe maintenant de nombreux protocoles, de plus en plus efficaces, pour différencier les CSPi en MN. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe aucun protocole de génération de NCS (Hansen et al., 2011; Sances et al., 2016), au mieux, on obtient des populations hétérogènes de neurones excitateurs (Sadegh and Macklis, 2014; Sances et al., 2016).

Les différents protocoles de génération des MN à partir de fibroblastes de peau de patients SLA ayant différentes mutations familiales ou étant sporadiques, ont permis de récapituler plusieurs aspects de la maladie. On retrouve ainsi plusieurs protéines formant des inclusions cytoplasmiques, la délocalisation du noyau vers le cytoplasme de protéines comme TDP-43 et FUS, la formation de loci d'ARN pour la mutation *C9ORF72* (Almeida et al., 2013; Donnelly et al., 2013; Egawa et al., 2012; Liu et al., 2015; Sareen et al., 2013; Wainger et al., 2014). Des phénotypes fonctionnels ont également été observés comme une augmentation significative de la mortalité (Bilican et al., 2012), une désorganisation des neurofilaments (Chen et al., 2014), des déficits du transport nucléocytoplasmique (Zhang et al., 2015), des changements de l'excitabilité (Kiskinis et al., 2014; Wainger et al., 2014). Des expériences de co-culture ont pu montrer et confirmer l'importance des cellules non-neuronales dans le développement de la pathologie. C'est notamment le cas des astrocytes, qui peuvent aussi être produits à partir de CSPi (Ferraiuolo et al., 2016; Meyer et al., 2014). Les futures études des CSPi vont permettre de mieux comprendre les mécanismes pathogéniques, notamment dans les formes sporadiques de la maladie. Elles devraient aussi être utiles pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, comme l'utilisation d'ARN anti-sens ou pour faire du screening (Van Damme et al., 2017).

Le développement des modèles de la SLA a permis de mieux comprendre sa physiopathologie cependant, la translation en clinique reste encore difficile à cause de la complexité de la maladie et de l'hétérogénéité des patients. De meilleurs résultats viendront avec l'utilisation de plusieurs modèles et le croisement des différents résultats qui vont faire progresser les connaissances sur la pathologie. Pour l'heure, les souris *Sod1* restent le modèle le plus utilisé et validé, qui récapitule la perte conjointe et sélective des NCS et des MN avec de nombreux aspects de la SLA.

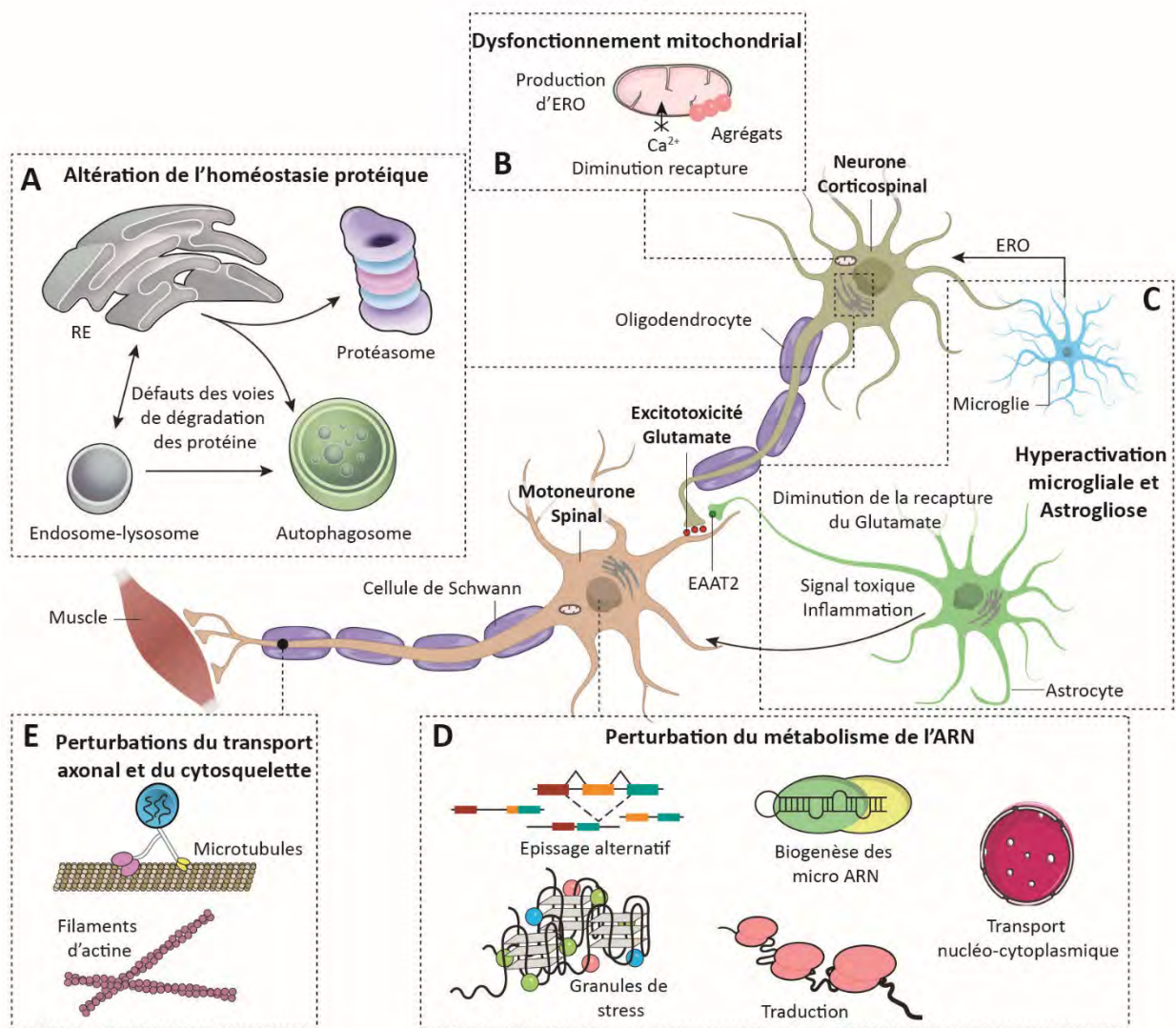
### **3. Mécanismes physiopathologiques**

La découverte de nouveaux gènes impliqués dans la SLA et l'émergence de modèles animaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent la SLA. Actuellement, de plus en plus d'études s'accordent à dire que le dysfonctionnement du métabolisme de l'ARN est au cœur de la physiopathologie de la SLA. Cependant, on peut également considérer la SLA comme une maladie multifactorielle

comprenant de nombreux dysfonctionnements cellulaires impliquant la mitochondrie, le transport cellulaire, le réticulum endoplasmique, le stress oxydant, la réponse inflammatoire, la dégradation des protéines et la formation d'agrégats etc. (Rossi et al., 2016).

### 3.1 Dégénérescence des neurones moteurs

La grande majorité des recherches précliniques sur les mécanismes physiopathologiques a été conduite sur les MN, laissant de côté l'analyse des NCS (Figure 14).



**Figure 14 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA.** A) L'homéostasie protéique est perturbée dans la SLA. De nombreux agrégats protéiques se forment, notamment à cause de protéines mal repliées qui échappent au système de dégradation des protéines. Les voies de l'autophagie sont altérées ainsi que le protéasome. B) Les mitochondries dysfonctionnent entraînant la production d'espèces réactives de l'oxygène

(ERO) et perdent leur pouvoir tampon du calcium et cumulent des agrégats protéiques. **C)** Dans la SLA, les microglies sont hyperactivées et une astrogliose est présente. Les cellules gliales envoient des messages toxiques pour les neurones et n'arrivent plus à recapter le glutamate. **D)** Le métabolisme de l'ARN est fortement impacté dans la SLA. On y retrouve plusieurs dysfonctionnements dans la traduction des ARN, l'épissage alternatif, la biogenèse des micro ARN et le transport nucléo-cytoplasmique. De plus, des granules de stress se forment. **E)** On retrouve des altérations des protéines du cytosquelette d'actine et des microtubules impactant fortement le transport axonal. Il est important de noter que ces mécanismes sont souvent généralisés aux NCS et aux MN, alors qu'ils ont été décrits principalement dans la moelle épinière. (Adaptation de (Taylor et al., 2016)).

### **3.1.1. Excitotoxicité glutamatergique**

Un des premiers mécanismes physiopathologiques mis en avant dans la SLA est l'excitotoxicité glutamatergique. Cette toxicité résulte d'une activation excessive des récepteurs glutamatergiques neuronaux, entraînant une élévation importante des concentrations intracellulaires de calcium, dommageable pour le neurone. La suractivation des récepteurs peut être due à une augmentation du glutamate relargué dans la fente synaptique, un défaut des transporteurs permettant sa recapture, un changement d'affinité des récepteurs postsynaptiques ou une augmentation du nombre de ces derniers (Ferraiuolo et al., 2011a). Chez les patients SLA, on retrouve des taux élevés de glutamate dans le liquide céphalo-rachidien (Shaw et al., 1995) et l'expression du transporteur de recapture astrocytaire EAAT2 est réduit dans les zones affectées par la maladie (Rothstein et al., 1992; Rothstein et al., 1990). L'hyperexcitabilité corticale engendre également une libération accrue du glutamate sur les MN (Foran and Trotti, 2009; Vucic et al., 2008), qui sont particulièrement vulnérable en raison d'une forte expression des récepteurs AMPA contenant la sous-unité Glur2 qui les rend très perméable au calcium (Williams et al., 1997). Ces altérations ont notamment été confirmées chez le modèle *SOD1<sup>G93A</sup>* où plusieurs études ont montré une altération de l'expression des sous-unités AMPA, une réduction d'EAAT2 (Howland et al., 2002; Trotti et al., 1999) et une perte de la recapture du glutamate par les astrocytes (Van Damme et al., 2007). De manière intéressante, le seul médicament autorisé en France, le Riluzole, est un anti-glutamatergique qui inhibe la libération du glutamate dans la fente synaptique (Ferraiuolo et al., 2011b).

### 3.1.2. Dysfonctionnement du métabolisme de l'ARN

Plusieurs mutations ont été identifiées dans des gènes liés au métabolisme de l'ARN. En effet, des gènes comme *TARDBP*, *FUS* et *hnRNP A1* encodent des protéines de liaison à l'ARN impliquées dans la transcription, l'épissage, les micro ARN, la traduction ou encore le transport des ARN (Kim et al., 2013; Kwiatkowski et al., 2009; Lagier-Tourenne et al., 2010; Liu et al., 2016; Polymenidou et al., 2011; Vance et al., 2009). Ces protéines interviennent dans toutes les étapes du métabolisme de l'ARN et lient plusieurs milliers d'ARN différents (Huelga et al., 2012; Lagier-Tourenne et al., 2012). D'autres gènes comme *SOD1* ou *C9ORF72* peuvent conduire à des dérégulations de l'ARN *via* des gains de fonctions toxiques (Butti and Patten, 2018; Taylor et al., 2016).

Dans la pathologie SLA, on retrouve les protéines TDP-43, FUS et hnRNP dans des granules de stress qui permettent la rétention d'ARN lors d'un stress cellulaire mais aussi leur transport au sein de la cellule (Dormann et al., 2010; Lin et al., 2015; Molliex et al., 2015; Patel et al., 2015). Cette compartimentalisation se fait grâce à des domaines de faible complexité présents sur ces protéines. Cependant, ces domaines sont très susceptibles à la fibrillation et à l'agrégation et des mutations causatives sont retrouvées de ces domaines (Kim et al., 2013; Lagier-Tourenne et al., 2010; Shang and Huang, 2016). Ainsi, on retrouve des agrégats cytoplasmiques des protéines TDP-43 et FUS entraînant une délocalisation de ces protéines nucléaires vers le cytoplasme (Neumann et al., 2006; Scekcic-Zahirovic et al., 2017; Van Deerlin et al., 2008; Yasuda et al., 2013). Certaines mutations retrouvées chez les patients affectent directement le site de localisation nucléaire (Kwiatkowski et al., 2009; Liu et al., 2016; Vance et al., 2009).

TDP-43 et FUS sont impliqués dans la biogenèse des miARN (Da Cruz et al., 2012; Freibaum et al., 2010) et notamment miR124, miR-218, miR-9 et miR-141/200a qui sont importants pour le développement des MN, leur spécification, la transmission synaptique et leur survie (Dajas-Bailador et al., 2012; Edbauer et al., 2010; Eitan and Hornstein, 2016; Kawahara and Mieda-Sato, 2012; Otaegi et al., 2011; Sun et al., 2012). Les concentrations de ces différents miARN sont globalement diminuées suite à un défaut de biogenèse, due aux mutations dans les gènes encodant les protéines nucléaires TDP-43 et FUS (Dini Modigliani et al., 2014; Eitan and Hornstein, 2016; Li et al., 2013; Zhang et al., 2013). Cette diminution entraîne une perte des fonctions propres aux miARN et pourrait précipiter la dégénérescence des neurones moteurs.



Les ARN contenant les répétitions de dinucléotides dues aux mutations de *C9ORF72* s'accumulent dans les cellules du cerveau et de la moelle épinière des patients SLA (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Gendron et al., 2013). Cette accumulation d'ARN cause le recrutement de protéines de liaison à l'ARN qui perdent alors leurs fonctionnalités et se retrouvent délocalisées (Lee et al., 2013; Simon-Sanchez et al., 2012). On retrouve ainsi une toxicité des ARN nouvellement formés.

### 3.1.3. Dérégulation de l'homéostasie protéique

La dégénérescence des neurones moteurs s'accompagne d'une formation progressive d'inclusions protéiques contenant des protéines mutées comme SOD1, FUS, TDP-43 et C9ORF72 (Ash et al., 2013; Mori et al., 2013b; Neumann et al., 2006; Pasinelli et al., 2004; Watanabe et al., 2001).

L'absence d'élimination des protéines ubiquitinées et l'augmentation des marqueurs d'autophagie indiquent que les deux voies de dégradation des protéines sont altérées dans la SLA : le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie (Li et al., 2008; Neumann et al., 2006; Sasaki, 2011). La protéine mutée SOD1 peut directement agir sur le protéasome et inhiber son action (Kabashi et al., 2004; Urushitani et al., 2002). L'ubiquitine-2 et sequestosome-1, deux protéines retrouvées mutées, sont responsables en situation physiologique de l'acheminement des protéines ubiquitinées vers le protéasome ou l'autophagosome pour y être dégradées (Deng et al., 2011; Fecto et al., 2011). Des défauts dans la maturation de l'autophagosome et la dégradation des endosomes sont causés par des mutations dans les gènes *CHMP2B* et *OPTN* (Maruyama et al., 2010; Parkinson et al., 2006). Les mutations des protéines VAPB et VCP créent quant à elles des défauts au niveau de la dégradation des protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique (RE) (Chen et al., 2010; Johnson et al., 2010; Tsuda et al., 2008; Tudor et al., 2010).

En plus des mutations affectant les fonctions du RE, plusieurs indications d'un stress du RE comme des altérations morphologiques et une augmentation de la réponse aux protéines non repliées sont retrouvées chez les patients SLA (Atkin et al., 2008; Oyanagi et al., 2008; Sasaki, 2010) et dans différents modèles animaux (Farg et al., 2012; Prell et al., 2012; Walker et al., 2013; Zhang et al., 2014b). Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, la protéine mutée et mal repliée se lie à la surface cytosolique du RE et bloque la dégradation des autres protéines mal

repliées et qui forment alors des agrégats (Kikuchi et al., 2006; Nishitoh et al., 2008; Tobisawa et al., 2003).

L'homéostasie protéique est perturbée par des altérations dans la synthèse des protéines au niveau du RE et dans la dégradation des protéines, induisant la présence d'inclusions protéiques. Cependant, la toxicité de ces agrégats pour les neurones n'est pas bien définie, ni s'ils sont une cause ou une conséquence de la neurodégénérescence.

#### **3.1.4. Défauts du cytosquelette et du transport axonal**

Les neurones moteurs sont des cellules ayant une forte polarisation et qui émettent leurs axones sur de grandes distances. Ces propriétés les rendent particulièrement dépendantes du transport axonal assurant l'acheminement dans tout leur cytoplasme des ARN, des protéines, des organites et toutes sortes de molécules. La désorganisation du cytosquelette axonal et la perturbation du trafic intracellulaire sont retrouvées dans les cas sporadiques et familiaux de SLA (Taylor et al., 2016). Les changements dans le transport axonal semblent être des marqueurs précoces de la maladie car certains signes apparaissent bien avant la dégénérescence des neurones (Bilsland et al., 2010; Burk and Pasterkamp, 2019).

On retrouve chez les patients SLA et dans différents modèles murins des altérations des protéines motrices, des microtubules et des neurofilaments qui font partie intégrante du transport axonal. Aussi bien dans les formes familiales que sporadiques, des neurofilaments s'accumulent dans les cornes ventrales de la moelle épinière (Mizusawa et al., 1989; Munoz et al., 1988). Dans le modèle murin *SOD1<sup>G93A</sup>*, on remarque une diminution de la tubuline et des neurofilaments dans les axones émanant de la racine ventrale de la moelle épinière. Plusieurs mutations rares ont été identifiées dans les gènes des neurofilaments à chaînes lourdes et dans le gène de la périphérine (PRPH) (Al-Chalabi et al., 1999; Corrado et al., 2011; Gros-Louis et al., 2004). Le taux de neurofilaments dans le liquide céphalorachidien est un bon indicateur du pronostic des patients SLA car il corrèle négativement avec la survie (Ganesalingam et al., 2013; Ganesalingam et al., 2011). De plus, la délétion de neurofilaments dans le modèle murin *SOD1<sup>G93A</sup>* retarde l'apparition de la pathologie et réduit sa progression (Williamson et al., 1998).

Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, on observe un ralentissement des transports rétrogrades et antérogrades, qu'ils soient lents ou rapides, et ceci bien avant la neurodégénérescence (Chen et al., 2007; Taylor et al., 2016; Williamson and Cleveland, 1999). Par ailleurs, certains gènes

encodant des protéines directement impliquées dans le transport axonal sont causatifs de la SLA. Les protéines intervenant directement dans le contrôle moteur du transport sont perturbées par des mutations dans leurs gènes. C'est le cas de *DNTC1*, qui encode la dynactine impliquée dans le transport rétrograde, (Ikenaka et al., 2013; Levy et al., 2006; Munch et al., 2007; Puls et al., 2003), ou encore de *KIF5A*, qui encode la kinésine impliquée dans le transport antérograde (Nicolas et al., 2018). Le taux d'expression des protéines du transport axonal corrèle avec la survie des modèles murins de SLA. En effet, chez les souris *SOD1<sup>G86R</sup>*, il a été montré que KAP3, une protéine du transport axonal rapide est augmentée chez les animaux développant la pathologie (Dupuis et al., 2000). Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, une diminution de l'expression de cette protéine induit une augmentation de la durée de vie des animaux (Landers et al., 2009). Dans le même sens, le croisement de souris hétérozygote pour *EPHA4* avec des souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, induit une augmentation de la survie (Van Hoecke et al., 2012).

D'autres acteurs du cytosquelette comme les filaments d'actines peuvent être également directement affectés par des mutations, notamment dans le gène *PFN1* (Wu et al., 2012). Pour les microtubules, une mutation dans le gène *TUB4A* a été retrouvée (Pensato et al., 2015; Smith et al., 2014). Les dysfonctionnements du transport axonal impliquent un mauvais acheminement de l'ARN, des facteurs de croissances et des mitochondries, et conduisent ainsi à des défauts de synthèse protéique, une diminution de la survie, et une altération du métabolisme énergétique. Ces cascades d'évènements induisent finalement la mort des neurones moteurs et montrent l'importance du transport axonal dans la SLA.

### **3.1.5. Altérations mitochondriales et stress oxydant**

La mitochondrie est un point de convergence de dérégulations intracellulaires observées dans la SLA : le métabolisme énergétique, le stress oxydant, l'homéostasie du calcium, l'excitotoxicité, le transport axonal et l'apoptose (Smith et al., 2017b).

Il existe plusieurs anomalies structurales et morphologiques indiquant un dysfonctionnement mitochondrial chez les patients SLA (Hirano et al., 1984; Okamoto et al., 1990; Sasaki and Iwata, 1999a, 2007). On retrouve les mêmes caractéristiques pathologiques dans les différents modèles de SLA, les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Dal Canto and Gurney, 1995; De Vos et al., 2007; Higgins et al., 2003; Jaarsma et al., 2001), *TDP-43<sup>M337K</sup>*, *TDP-43<sup>Q331K</sup>*, *TDP-43<sup>A315T</sup>* (Gautam et al., 2019; Magrane et al., 2014; Wang et al., 2013), les fibroblastes de patients *C9ORF72* (Onesto et al., 2016). De plus, il existe une mutation causative de la SLA dans le gène

*CHCHD10* qui code pour une protéine mitochondriale localisée aux sites de contacts entre la membrane interne et la membrane externe. Cette mutation cause un effet profond sur la structure de la mitochondrie et sur l'activité de la chaîne de transport des électrons (Bannwarth et al., 2014; Genin et al., 2016). Ces anomalies sont couplées à des changements de l'activité des différents complexes de la chaîne de transfert des électrons et induisent une baisse de la respiration cellulaire et une diminution de la production d'ATP aussi bien chez les patients (Crugnola et al., 2010; Vielhaber et al., 2000; Wiedemann et al., 2002; Wiedemann et al., 1998) que dans les modèles murins *SOD1<sup>G37R</sup>* et *SOD1<sup>G93A</sup>* (Cousse et al., 2011; Kirkinetzos et al., 2005; Mattiazzi et al., 2002).

Les défauts mitochondriaux entraînent dans leurs sillages plusieurs perturbations intracellulaires, notamment *via* la production majoritaire des espèces réactives de l'oxygène, produits toxiques de la respiration cellulaire. En condition physiologique, il existe un système de détoxification dont fait partie la SOD1, une enzyme antioxydante qui catalyse la dismutation des anions superoxydes en peroxydes d'hydrogène. La SLA est caractérisée par un stress oxydant provoqué par une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (Barber and Shaw, 2010). Il a été montré que la protéine SOD1 est capable de s'accumuler anormalement dans l'espace intramembranaire mitochondrial et empêche ainsi l'import de protéines essentielles au fonctionnement des mitochondries (Liu et al., 2004; Wong et al., 1995). SOD1 est elle-même sensible au stress oxydant (Rakhit et al., 2002) à cause de sa mauvaise conformation ou de son agrégation. Cela crée alors un cercle vicieux puisque l'agrégation de SOD1 impacte le fonctionnement mitochondrial et induit une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (Israelson et al., 2010; Pickles et al., 2013; Pickles et al., 2016). Les mitochondries sont des acteurs majeurs de l'homéostasie du calcium intracellulaire. Dans la SLA, les mitochondries perdent leur capacité à absorber le calcium (Damiano et al., 2006), induisant une élévation des taux de calcium cytosolique et à une excitotoxicité. Cette perturbation peut s'expliquer par la dérégulation de la communication entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique observée dans les modèles animaux et chez les patients (Lau et al., 2018; Siklos et al., 1996; Stoica et al., 2014; Stoica et al., 2016).

Finalement, les mitochondries sont également capables d'activer directement l'apoptose des neurones par la libération de cytochrome c. Les agrégats de SOD1 mutée peuvent interagir avec les différents acteurs pro- ou anti-apoptotiques et entraîner une activation anormale de l'apoptose (Pasinelli et al., 2004; Pedrini et al., 2010).

### 3.2 Atteintes d'autres types cellulaires

Les premières études des mécanismes physiopathologiques se sont focalisées sur la dégénérescence des MN, et ont mis en évidence des dérégulations intrinsèques, c'est à dire propres aux MN, et responsables de ce que l'on nomme la mort cellulaire autonome. Cependant, de nombreuses études ont également montré l'implication d'autres types cellulaires dans la mort des MN, et l'existence de mécanismes extrinsèques. On parle alors de mort cellulaire non-autonome. Ces deux types de mécanismes sont retrouvés dans la SLA.

#### 3.2.1. Les cellules gliales

La neuroinflammation est un terme utilisé pour décrire la réaction de cellules gliales résidentes (astrocytes, microglies) et de cellules immunitaires circulantes (monocytes, neutrophiles, lymphocytes) qui entrent et interagissent avec les cellules nerveuses dans un contexte d'infection, de blessures ou de dégénérescence (McCauley and Baloh, 2019). Dans la SLA, on retrouve une neuroinflammation importante dans les tissus post-mortem des patients et dans les tissus des différents modèles murins de SLA. Cela démontre l'implication des cellules gliales dans le développement de la pathologie (Brites and Vaz, 2014; Corcia et al., 2012). Les astrocytes et les microglies participent activement à la physiopathologie de la SLA *via* une réponse inflammatoire locale avec un changement de phénotype, une activation suivie d'une migration vers les sites de neurodégénérescence, ainsi qu'une prolifération et une sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (Corcia et al., 2012; Kawamata et al., 1992; Nagy et al., 1994; Sasaki and Maruyama, 1994; Schiffer et al., 1996; Troost et al., 1992; Turner et al., 2004; Zurcher et al., 2015). Certaines cellules immunitaires circulantes, comme les lymphocytes T, ont été retrouvées dans les tissus nerveux (Engelhardt et al., 1993). Outre les altérations au niveau du système nerveux central et périphérique, on retrouve une inflammation systémique caractérisée par la présence de marqueurs inflammatoires et immuns dans le sang. (Almer et al., 2001; Almer et al., 2002; Henkel et al., 2004; Lu et al., 2016; Murdock et al., 2017; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2011). Ces nombreuses altérations sont retrouvées dans les modèles animaux (Alexianu et al., 2001; Jara et al., 2017; Jara et al., 2012; Keller et al., 2009; Levine et al., 1999; Ozdinler et al., 2011).

Dans le modèle *SOD1<sup>G93A</sup>*, des altérations des microglies sont déjà présentes à un stade pré-symptomatique où l'on observe une baisse de leur nombre puis une activation lors du

stade symptomatique (Gerber et al., 2012). La réponse immunitaire peut donc être précoce (Jara et al., 2017). Les microglies sécrètent de nombreux facteurs pro-inflammatoires neurotoxiques (Corcia et al., 2012; Henkel et al., 2006; Henkel et al., 2004; Meissner et al., 2010; Nguyen et al., 2001), à cela s'ajoutent les sécrétions neurotoxiques des astrocytes (Endo et al., 2015; Johann et al., 2015; Pehar et al., 2004), qui sont capables d'induire spécifiquement la mort des MN (Nagai et al., 2007). La transplantation d'astrocytes exprimant le transgène *SOD1<sup>G93A</sup>* dans la moelle épinière de rats sauvages induit la dégénérescence des MN (Papadeas et al., 2011). De plus, la diminution des facteurs neuroprotecteurs normalement sécrétés par ces cellules participe également à la vulnérabilité des MN et à leur dégénérescence (Ferraiuolo et al., 2011b; Foran et al., 2011; Ganel et al., 2006; Van Damme et al., 2007).

Les souris possédant la mutation G37R ou G85R sur le gène de la *SOD1* ont l'avantage de posséder des sites LoxP de part et d'autre de la mutation. Ainsi, la mutation peut être excisée spécifiquement dans certains tissus lorsque la *Cre recombinase* y est exprimée. Lorsque la *Cre recombinase* est exprimée sous le promoteur microgliale du gène *CD11b*, la toxicité microgliale diminue et la survie des souris est prolongée (Boillee et al., 2006). De plus, l'introduction de microglies saines dans des souris *SOD1<sup>G93A</sup>* dépourvues de microglies ralentit la mort des MN et prolonge la survie des souris (Beers et al., 2006). Quand la mutation est excisée dans les astrocytes suite à l'expression de la *Cre recombinase* sous le promoteur de la *GFAP* on observe un ralentissement de la progression de la maladie et une inhibition de l'activation des microglies (Wang et al., 2011; Yamanaka et al., 2008b).

Les cellules microgliales interviennent donc directement dans l'initiation et la progression de la pathologie SLA tandis que les astrocytes sont impliqués dans la progression de la maladie.

Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann sont aussi impliqués puisqu'il a été montré chez les patients SLA une perte de la myéline, qui est moins compacte et présente moins de lipides (Hayashi et al., 2001). Chez les souris, on observe une dégénérescence de la gaine de myéline (Niebroj-Dobosz et al., 2007). On constate également une altération de la structure des oligodendrocytes dans la moelle épinière des souris *FUS* (Scekic-Zahirovic et al., 2017). L'excision spécifique de la mutation *SOD1<sup>G37R</sup>* des oligodendrocytes retarde l'apparition de la maladie et diminue l'astrocytose ainsi que l'activation microgliale (Kang et al., 2013). Pour les cellules de Schwann, leur implication est plus controversée. Il existe bien des défauts myéliniques dans le système nerveux périphérique des patients SLA et la suppression de la

mutation *SOD1*<sup>G37R</sup> dans ces cellules accélère la progression de la maladie (Lobsiger et al., 2009). En revanche, l'accumulation de *SOD1*<sup>G93A</sup> dans les cellules de Schwann n'est pas pathologique (Turner et al., 2010a) et la surexpression spécifique et unique de la *SOD1*<sup>G93A</sup> dans ces cellules n'entraîne pas de phénotype moteur ni de perte des MN (Turner et al., 2010a).

### 3.2.2. Les neurones sérotoninergiques

Dans le noyau du raphé, au niveau du tronc cérébral, les neurones sérotoninergiques envoient leurs axones vers la moelle épinière et sont capables d'influencer l'activité électrique des MN (Lemon, 2008). Cela confère aux neurones sérotoninergiques un rôle important dans la locomotion (Antri et al., 2002; Murray et al., 2010; Ribeiro-do-Valle et al., 1991). Dans la SLA, le noyau du raphé n'est que très peu affecté par la pathologie TDP-43 (Brettschneider et al., 2013a). En revanche, le système sérotoninergique dans son ensemble est fortement affecté. En effet, on observe une diminution du précurseur de la sérotonine, le tryptophane, une diminution du métabolite l'acide 5-hydroxyindoleacétique (5-HIAA) dans le liquide céphalorachidien, le plasma et/ou la moelle épinière (Bertel et al., 1991; Monaco et al., 1979; Ohsugi et al., 1987; Sofic et al., 1991). Ces altérations s'accompagnent également d'une diminution de l'expression du récepteur 5-HT1A dans la moelle épinière (Turner et al., 2005). De plus, le taux de sérotonine plaquettaire est positivement corrélé à la survie des patients. La diminution de la production de sérotonine par les plaquettes pourrait être le miroir des changements observés au niveau central (Dupuis et al., 2010).

Il a été montré aussi bien chez les patients SLA que dans les modèles murins *SOD1*<sup>G37R</sup> *Sod1*<sup>G86R</sup> que les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dégénèrent au cours de la maladie, avec une atrophie des corps cellulaires et une perte des projections induisant une diminution de sérotonine dans la moelle épinière (Dentel et al., 2013; El Oussini et al., 2017). L'importance de l'implication des neurones sérotoninergiques dans le développement de la SLA a été montrée récemment au laboratoire. En effet, lorsqu'on retire spécifiquement le mutant *SOD1*<sup>G37R</sup> des neurones sérotoninergiques, on diminue la spasticité mais on aggrave les déficits moteurs et la paralysie terminale apparaît plus rapidement (El Oussini et al., 2017).

La sérotonine a un effet facilitateur sur la transmission glutamatergique et passe par l'activation des récepteurs 5-HT1/2 (Sandyk, 2006). Dans la SLA, la déplétion en sérotonine dans la moelle épinière pourrait conduire à la mise en place de mécanismes compensatoires

*via* l'augmentation de l'excitabilité des MN et une augmentation du glutamate libéré par les NCS (Bertel et al., 1991; El Oussini et al., 2017).

### **3.2.3. Interneurones spinaux**

Les interneurones régulent de très nombreux systèmes neuronaux et participent à l'équilibre excitation/inhibition et sont donc des contributeurs importants de l'homéostasie des réseaux neuronaux spinaux (Turner and Kiernan, 2012). La dégénérescence des MN peut être en partie attribuée à des dysfonctionnements des réseaux neuronaux spinaux et à la perte de populations d'interneurones (King et al., 2016). L'étude histologique de la moelle épinière de patients SLA montre la présence d'inclusions cytoplasmiques positives pour l'ubiquitine dans les interneurones (Stephens et al., 2001) et une perte d'interneurones positifs pour la calbindine dans la corne ventrale (Stephens et al., 2006). On y retrouve une perte des synapses glycinergiques mais pas de celles GABAergiques (Malessa et al., 1991). Chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, la perte des interneurones spinaux se fait en parallèle de la dégénérescence des MN et de l'apparition de la gliose réactionnelle (Morrison et al., 1998). La présence d'agrégats positifs pour l'ubiquitine est aussi retrouvée chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* et *TDP-43<sup>A315T</sup>* (Martin et al., 2007; Wegorzewska et al., 2009). Des études morphologiques des interneurones spinaux de jeunes souris présymptomatiques ont montré des altérations des dendrites, de leurs aires, branchements et terminaisons (Amendola and Durand, 2008; Elbasiouny et al., 2010). Cela implique également un changement de l'excitabilité (Duch et al., 2008) et une perte des synapse glycinergiques mais pas GABAergiques (Chang and Martin, 2009, 2011).

La cellule de Renshaw est un interneurone inhibiteur glycinergique faisant directement synapse sur les MN. Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, l'étude de ces cellules a permis de montrer une perte de la connectivité avec les MN (Wootz et al., 2013) et même une perte cellulaire (Chang and Martin, 2009). Cependant, leur implication chez les patients SLA demeure incomprise (King et al., 2016).

### **3.2.4. Cellules du muscle strié squelettique**

Le rôle du muscle dans la SLA reste encore très controversé. Le démantèlement des jonctions neuromusculaires (JNM) est un événement précoce dans la physiopathologie de la



SLA, il intervient avant la perte des MN (Fischer et al., 2004; Gonzalez de Aguilar et al., 2008; Jokic et al., 2006; Martineau et al., 2018). De plus, la rétractation du nerf terminal et la perte définitive des JNM se font également avant la dégénérescence des MN (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006). Ces études ont suggéré que les cellules musculaires pourraient jouer un rôle actif dans le développement de la SLA et non pas seulement être passives et souffrir de la perte des MN (Loeffler et al., 2016). En effet, plusieurs études montrent que le muscle est une structure rapidement affectée par la maladie, bien avant l'apparition des symptômes moteurs. Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, la protéine mutée se retrouve progressivement agrégée dans les muscles des membres inférieurs (Turner et al., 2003). Ceci est accompagné d'une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (Halter et al., 2010; Xiao et al., 2018) et d'une augmentation du métabolisme oxydatif musculaire (Capitanio et al., 2012; Palamiuc et al., 2015). Outre une baisse significative du volume musculaire à des stades asymptomatiques (Marcuzzo et al., 2011), on peut noter la présence de nombreuses altérations moléculaire dans les fibres musculaires (de Oliveira et al., 2014; Galbiati et al., 2012; Park and Vincent, 2008). D'autres perturbations métaboliques ont également été observées chez les souris *TDP-43<sup>A315T</sup>* (Stallings et al., 2013). Chez les patients SLA, on retrouve notamment les altérations mitochondriales (Crugnola et al., 2010; Siciliano et al., 2002; Siciliano et al., 2001; Vielhaber et al., 2000; Vielhaber et al., 1999; Wiedemann et al., 1998). Il semblerait donc que le muscle puisse être affecté de manière indépendante de la perte des MN. L'expression restreinte de la *SOD1<sup>G93A</sup>* mutée dans le muscle provoque une diminution de la force musculaire, une atrophie et des déficits mitochondriaux avec une axonopathie et une perte des MN (Dobrowolny et al., 2011; Wong and Martin, 2010).

### **3.2.5. Métabolisme énergétique et hypothalamus**

Les défauts dans la balance énergétique, la perte de poids et les altérations du comportement alimentaire sont retrouvés chez un certain nombre de patients SLA. Ces différentes altérations métaboliques peuvent provenir de causes centrales et périphériques. Au niveau central, l'hypothalamus regroupe plusieurs noyaux impliqués dans la prise alimentaire et la régulation de la balance énergétique (Vercruyse et al., 2018). Des analyses post-mortem ont montré que la pathologie TDP-43 se retrouve dans l'hypothalamus d'un tiers des patients SLA (Cykowski et al., 2014). Récemment, des études d'IRM de patients ont montré qu'il existe une atrophie de l'hypothalamus chez les patients, mais aussi, avant l'apparition

des symptômes chez des porteurs de mutations *C9ORF72*, *SOD1*, *NEK1*, *TARDBP* et *FUS* (Gorges et al., 2017).

Chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, la perte de poids apparaît progressivement, bien avant l'apparition des premiers symptômes moteurs, à cause d'une dépense énergétique accrue (Dupuis et al., 2004). De plus, un régime alimentaire hypercalorique enrichi de gras permet de restaurer partiellement le phénotype moteur en agissant sur la jonction neuromusculaire et le maintien des MN (Dupuis et al., 2004). Dans les modèles *TDP-43<sup>A315T</sup>*, *TDP-43<sup>WT</sup>* on observe également une perte de poids et une diminution de la masse graisseuse (Shan et al., 2010; Stribl et al., 2014). Les études chez les rongeurs ont permis de mettre en évidence des altérations profondes de l'hypothalamus. En effet, le système de la mélanocortine hypothalamique, impliqué dans la prise alimentaire, est fortement impacté et ce déjà à des stades présymptomatiques, dans trois modèles murins différents, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, *FUS<sup>ΔNLS/+</sup>* et *TDP-43<sup>A315T</sup>* (Vercruysse et al., 2016). Ces altérations ont notamment été liées à la perte des projections sérotoninergiques dues à la dégénérescence des neurones dans le noyau raphé chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Conjointement, ces résultats tendent à prouver l'implication des défauts hypothalamiques dans les altérations métaboliques observées chez les patients SLA.

#### **4. Traitements et approches thérapeutiques**

Compte tenu de la diversité des signes cliniques et de l'étiologie encore inconnue de la SLA, il n'existe pour l'heure aucun traitement curatif de la maladie. De nombreux essais cliniques ont déjà été lancés mais aucun n'a donné de réelle satisfaction. Cependant, la progression de la SLA peut être ralentie par des traitements symptomatiques regroupant plusieurs disciplines. Ainsi, l'interaction entre le neurologue, les médecins spécialisés (pneumologue, gastro-entérologue, ORL), les professionnels paramédicaux (kinésithérapeute, ergothérapeute, orthophoniste, diététicien) et le psychologue clinicien spécialisé est indispensable à la bonne prise en charge du patient (Chio et al., 2006; Dorst et al., 2018; Paganoni et al., 2015).

##### **4.1 Médicaments autorisés**

Depuis 1995 en Europe, le Riluzole (Rilutek®) est le seul médicament approuvé et utilisé. D'après les premières études, ce médicament permet de prolonger l'espérance de vie

de 6 mois et d'augmenter le taux de survie des patients SLA (Bensimon et al., 1994; Riviere et al., 1998; Zoccolella et al., 2007). Mais des études plus récentes ont montré que l'effet serait plus modéré, avec uniquement 3 mois d'espérance de vie supplémentaires (Miller et al., 2012). Les mécanismes d'action de cet agent neuroprotecteur ne sont pas encore totalement connus. Il agirait par plusieurs mécanismes, notamment par la régulation du métabolisme du glutamate. En effet, des études ont montré que le Riluzole augmente la recapture (Fumagalli et al., 2008) et inhibe la libération du glutamate (Wang et al., 2004). Il agit également en inhibant les canaux sodiques voltages dépendant (Urbani and Belluzzi, 2000; Zona et al., 1998). Ainsi, le Riluzole diminuerait la concentration extracellulaire de glutamate et permettrait de réduire l'excitotoxicité glutamatergique, une des possibles étiologies de la SLA. Ce médicament possède donc un effet modéré pour un coût élevé mais une bonne tolérance de la part des patients.

En mai 2017, les États-Unis ont accepté l'Edaravone (Radicava®) comme nouveau traitement pour la SLA (Abe et al., 2017; Sawada, 2017). Ce médicament est un antioxydant originellement utilisé après un accident vasculaire cérébrale au Japon. Son mode d'action dans la SLA n'est pas encore connu. L'unique étude qui a conduit à la mise sur le marché de cette molécule reste encore très discutée, c'est la raison pour laquelle il n'est toujours pas prescrit en Europe. En effet, il a été montré que l'Edaravone permet de ralentir la progression de la SLA mais uniquement sur un sous-groupe de patients SLA japonais, avec des caractéristiques cliniques distinctes. En effet, ces patients n'avaient que peu d'atteintes motrices, une dysphagie faible à modérée et aucun signe d'atteinte des fonctions respiratoires. Il n'existe aucune preuve de son effet sur d'autres types de patients SLA. De plus, aucune information n'est disponible sur l'effet de cette molécule sur la survie des patients (Al-Chalabi et al., 2017).

## **4.2 Traitements symptomatiques**

### **4.2.1. Symptômes moteurs**

Les symptômes musculaires se traitent de façon empirique car il n'existe pas d'étude convaincante prouvant l'efficacité de tel ou tel traitement (Baldinger et al., 2012; Dorst et al., 2018). Pour les crampes, des dérivés de la quinine ou du magnésium peuvent être prescrits pour diminuer leur fréquence d'apparition. Pour la spasticité, les patients peuvent se voir

prescrire des médicaments antispastiques comme le Baclofène. Les fasciculations ne sont ni dangereuses ni douloureuses mais peuvent être anxiogènes, le médecin peut donc simplement prescrire du magnésium à haute dose ou des anxiolytiques. Dans tous les cas, la prise en charge par un kinésithérapeute est fortement recommandée. Le but thérapeutique est de préserver la fonction motrice résiduelle, prévenir l'atrophie due à l'immobilité, prévenir les douleurs musculosquelettiques et réaliser des étirements pour diminuer la spasticité (Dorst et al., 2018; Paganoni et al., 2015).

#### **4.2.2. Symptômes non moteurs**

La perte de poids rapide des patients est associée à un mauvais pronostic et une corrélation négative a été établie entre la perte de poids et le score ALSFRS, témoignant de la sévérité de la maladie (Desport et al., 1999; Dupuis et al., 2008; Lindauer et al., 2013; Marin et al., 2011). Dans le modèle animal *Sod1<sup>G86R</sup>*, un régime alimentaire supplémenté en gras est associé à une prise de poids et une augmentation de la survie (Dupuis et al., 2004). Une étude prospective a montré que la stabilisation du poids avec un régime hypercalorique (riche en graisses et sucres) est possible chez les patients SLA (Dorst et al., 2013). Plusieurs essais cliniques sont en cours pour asseoir ces résultats initiaux. Actuellement, les recommandations sont un suivi régulier de l'état nutritionnel des patients, avec un régime hypercalorique et des suppléments alimentaires pour stabiliser le poids (Korner et al., 2013). Lorsque le patient présente des troubles de la déglutition ou que le risque de fausse route est trop important, la gastrostomie est pratiquée (Dorst et al., 2015; Dorst et al., 2018; Group, 2015).

Au cours de la maladie, les patients SLA développent une insuffisance respiratoire chronique due à la faiblesse progressive des muscles du diaphragme et des muscles respiratoires auxiliaires. Le recours à une assistance respiratoire est donc obligatoire et doit se faire dès l'apparition des premiers symptômes respiratoires. La ventilation non invasive a montré son efficacité dans deux études distinctes en prolongeant de 7 à 13 mois la survie des patients (Berlowitz et al., 2016; Bourke et al., 2006). Elle améliore également grandement la qualité de vie des patients (Mustfa et al., 2006) et la qualité de leur sommeil, diminue la fatigue et la dépression (Butz et al., 2003; Dorst et al., 2018). En dernier recours, ou en cas d'hyper salivation, une trachéostomie peut être effectuée. Si l'intervention permet d'améliorer grandement la survie (Spataro et al., 2012), elle a de lourdes répercussions sur la qualité de vie en raison de son caractère très invasif, et est souvent refusée (Dorst et al., 2018).

La douleur est une composante importante à prendre en compte lors de la prise en charge des patients. Elle est fréquente, surtout dans les stades avancés, et peut être causée par différents symptômes comme la spasticité, les crampes, les contractures, des neuropathies etc. (Brettschneider et al., 2013b; Ganzini et al., 1999). Actuellement, le traitement de la douleur se base sur l'utilisation d'analgésiques en soins palliatifs. Certains de ces analgésiques peuvent également avoir des effets bénéfiques sur d'autres symptômes comme l'anxiété et la dépression mais aussi la salivation excessive et les difficultés à respirer. Concernant les troubles cognitifs que l'on retrouve chez plus de 30% des patients, il n'existe pas de traitement symptomatique (Dorst et al., 2018).

### **4.3 Approches thérapeutiques alternatives**

Les avancées de la génétique, le développement de modèles animaux de la SLA et les études précliniques ont permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques et essais cliniques. Cependant, la transition entre les études précliniques et cliniques reste pour l'heure un échec (DeLoach et al., 2015; Kumar et al., 2016; Petrov et al., 2017).

#### **4.3.1. Thérapies pharmacologiques**

L'étiologie de la SLA reste encore largement méconnue, mais il est certain que les mécanismes pathologiques qui soutiennent la SLA sont multiples et variés. Ainsi, les premières approches thérapeutiques développées ont tenté de bloquer ces différents mécanismes par l'utilisation de techniques pharmacologiques. Cependant, mises à part les deux molécules autorisées, aucune autre molécule n'a montré d'effet positif chez l'homme, malgré les résultats encourageant chez les modèles animaux (Kumar et al., 2016). Des molécules anti-oxydatives, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques, neuroprotectrices, ont été produites. Certaines études ont tenté d'apporter des facteurs neurotrophiques pour sauver les neurones en souffrance chez les patients SLA mais les résultats n'ont pas été à la hauteur des espérances compte tenu de la faible biodisponibilité et de leur faible délivrance aux MN. Ainsi, deux études ont montré un effet très modeste (Borasio et al., 1998; Lai et al., 1997) et une autre pas d'effets du tout (Sakowski et al., 2009; Sorenson et al., 2008).

### **4.3.2. Thérapies cellulaires**

A l'origine, l'utilisation de cellules souches avait pour but de remplacer les populations neuronales perdues. Cependant, cette idée c'est rapidement heurté à l'incapacité de ces cellules indifférenciées à devenir des neurones et à émettre un axone sur de longues distances, le tout dans un environnement neurodégénératif défavorable. Par la suite, les cellules souches ont été utilisées comme support neurotrophique permettant l'apport de nutriments et de facteurs neuroprotecteur permettant la protection et l'amélioration de la survie des MN (Goutman, 2017). La majorité des essais cliniques se basent sur la transplantation de cellules autologues pour éviter les rejets du système immunitaire et l'utilisation de cellules non-neuronales à cause de l'environnement neurodégénératif dans lequel ces cellules sont injectées (Martinez et al., 2017). Différents types de cellules ont été utilisées comme les cellules souches mésenchymateuses (Karussis et al., 2010; Oh et al., 2016; Staff et al., 2016; Sykova et al., 2017), les cellules souches hématopoïétiques (Blanquer et al., 2012; Garcia Santos et al., 2016) et les progéniteurs neuronaux fœtaux (Feldman et al., 2014; Glass, 2012; Glass et al., 2016; Mazzini et al., 2018).

La plupart des études ont engagé très peu de patients, provenant généralement d'un seul centre SLA et ont été conduites avec des protocoles différents et les paramètres mesurés différent également (Mazzini et al., 2018). Compte tenu de la faiblesse des effectifs, du manque de contrôle et de placebo, aucune conclusion ne peut être retenue quant à l'efficacité de ces méthodes. En revanche, toutes les études s'accordent à dire que l'injection de cellules souches est sans risque et bien tolérée par les patients SLA, même si des données sur le long terme manquent encore (Mazzini et al., 2018). Le choix du site d'injection (intraspinal, intraveineux, intrathécale) doit encore être mieux défini et le dosage optimal n'est pas encore déterminé. Il reste donc encore plusieurs ajustements à faire avant de pouvoir tester l'efficacité de ces méthodes, en plus de la standardisation des protocoles.

### **4.3.3. Thérapies géniques**

La thérapie génique est une technique qui consiste à introduire du matériel génétique dans des cellules cibles pour corriger une anomalie. Cela peut passer par le remplacement ou la suppression d'un gène défectueux mais aussi par l'apport d'un nouveau gène. Plusieurs techniques existent parmi lesquelles on retrouve les oligonucléotides antisens (OAS). Il s'agit

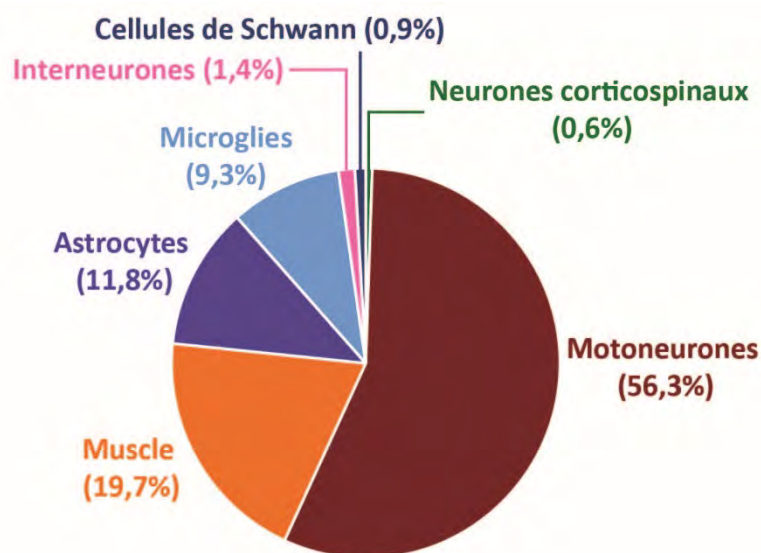
de petits fragments d'ARN qui lient une partie bien spécifique des ARNm pour bloquer la production des protéines associées.

Le succès de la thérapie génique dans le cas de l'amyotrophie spinale infantile a suscité beaucoup d'espoir pour les patients SLA ayant des formes familiales. En effet, dans cette maladie, une mutation du gène *SMN1* induit une mortalité dès les premières années de vie de l'enfant, en raison de son incapacité à développer ses capacités motrices. L'administration d'OAS permettant d'augmenter la quantité de protéines *SMN1* fonctionnelle, ou l'injection d'un virus contenant le gène sain *SMN1*, chez des enfants tout juste diagnostiqués, permettent une récupération fonctionnelle motrice impressionnante et une augmentation nette de leur espérance de vie (Finkel et al., 2017; Wood et al., 2017). Ces techniques pourraient être appliquées aux patients SLA présentant des mutations génétiques pour les corriger, notamment en utilisant des OAS qui bloqueraient la production de protéines mutées, qui bien souvent gagnent une fonction toxique. Idéalement, il faudrait cibler uniquement les transcrits portant les aberrations génétiques et laisser les transcrits sains être traduits en protéines, lorsque cela est possible. Il y a encore beaucoup de recherches précliniques à faire pour comprendre comment se comportent les différentes mutations chez les patients SLA. Un autre problème est que chez la plupart des patients SLA, il n'y a pas de mutations génétiques connues. Il serait donc intéressant de développer des stratégies thérapeutiques ne visant pas directement les mutations mais plutôt visant les voies impliquées dans la pathogénicité de la SLA (Klim et al., 2019).

# CHAPITRE III : Cortex cérébral et sclérose latérale amyotrophique

## 1. Place du cortex dans la recherche sur la SLA

La SLA implique plusieurs systèmes et plusieurs types cellulaires. Néanmoins, les principaux signes cliniques émanent de la perturbation de l'axe moteur NCS-MN-Muscle. La SLA peut se définir de façon simple comme étant une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte progressive, conjointe et sélective des NCS et des MN. Malgré cette simplification, il est effarant de constater que le cortex et les NCS ont été négligés dans les recherches précliniques (Figure 15). Pourtant, de plus en plus d'études cliniques chez les patients s'accordent à penser que le cortex moteur et ses projections jouent un rôle prépondérant dans le déclenchement et la progression de la SLA. Les découvertes récentes en imagerie médicale, en génétique et en électrophysiologie ont permis de faire un grand pas dans la compréhension des dysfonctionnements du cortex cérébral et des voies corticogufes chez les patients SLA (Eisen et al., 2017; Verde et al., 2017).



**Figure 15 : Les neurones corticospinaux sont peu représentés dans les études précliniques.** Graphique représentant le pourcentage d'études conduites chez la souris impliquant les différents types cellulaires affectés dans la SLA. Les chiffres ont été obtenus en réalisant une recherche PubMed à l'aide des mots clefs « ALS » et « Mice » et chacun des types cellulaires représentés.



Plusieurs raisons peuvent expliquer la négligence du cortex et des NCS dans les recherches précliniques. Premièrement, l'émergence de données montrant une dégénérescence primaire des jonctions neuromusculaires avant les MN (Fischer et al., 2004) a contribué à faire de la perte des NCS une conséquence secondaire. Or, on sait que la dégénérescence Wallérienne des MN, n'indique pas s'ils sont affectés avant ou après les NCS (Eisen et al., 2017). Deuxièmement, un manque de technique permettant l'étude du cortex et des NCS a freiné les recherches dans les modèles de SLA. Les NCS représentent une petite population de neurones parmi de nombreuses autres formant l'hétérogénéité cellulaire et moléculaire du cortex. Il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueur spécifique permettant de les identifier et de les distinguer des autres neurones à projections subcérébrale de la couche V, et seul un marquage rétrograde permet de les marquer sélectivement. Cela représente un travail fastidieux par rapport aux simples immunomarquages que l'on peut réaliser dans la moelle épinière pour identifier les MN. Les techniques permettant de tester le fonctionnement du cortex, des NCS et du tractus corticospinal sont également bien plus lourdes et contraignantes à mettre en place chez la souris. Il n'existe pas de culture cellulaire permettant de modéliser les NCS alors que le développement de culture de MN de souris et même de MN à partir de cellules souches pluripotentes induites est déjà bien avancé (Van Damme et al., 2017). Troisièmement, les différences d'organisation des systèmes moteurs humain et murin ont questionné la pertinence des modèles animaux de la SLA. Cependant, malgré ces différences, certains modèles murins récapitulent bien les symptômes typiques de la SLA. En dépit de leurs limites, les modèles murins et notamment les souris *Sod1*, restent actuellement les meilleures modélisations de la SLA puisqu'un nombre non négligeable de liens entre les patients et les souris ont déjà pu être établis (De Giorgio et al., 2019).

## **2. Dysfonctionnements corticaux**

### **2.1 Chez les patients SLA**

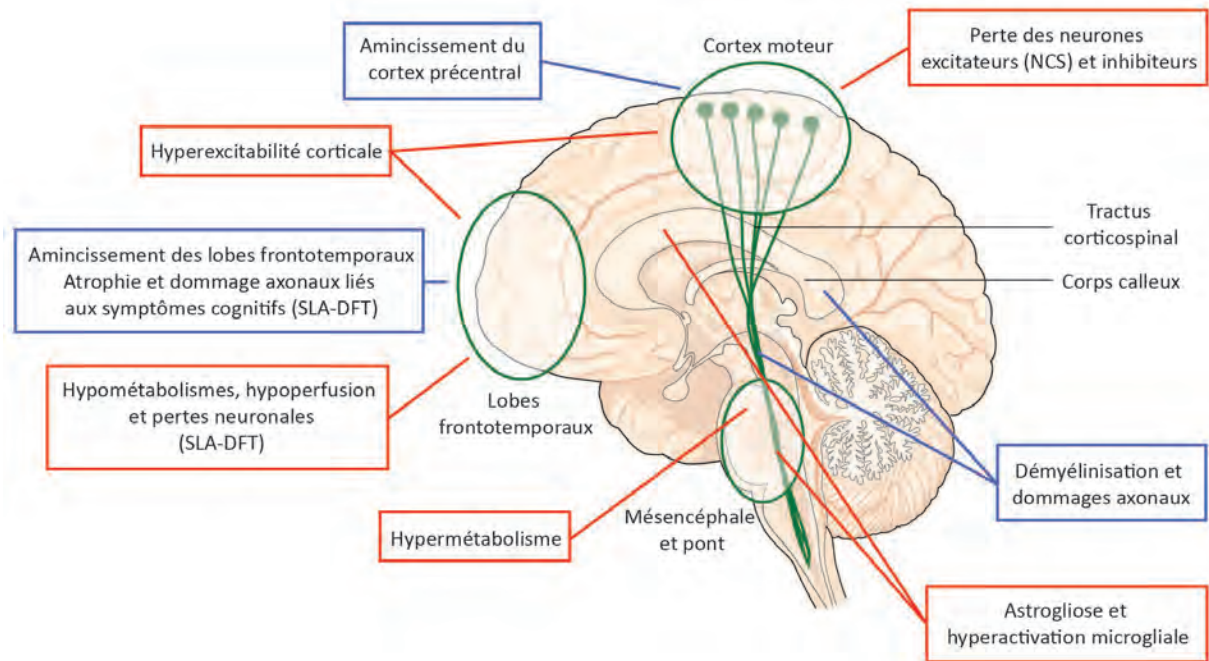
L'imagerie médicale permet l'exploration non invasive du cerveau, et notamment du cortex cérébral, et constitue l'un des moyens de suivi longitudinal des patients atteints de SLA. Ainsi, il a été observé par IRM quantitative, un amincissement cortical au niveau de l'aire M1, du lobe temporal et du lobe pariétale (Turner et al., 2007; Verstraete et al., 2012; Verstraete

et al., 2011). De manière remarquable, il a été démontré que l'amincissement au niveau temporal corrèle négativement avec la vitesse de progression de la maladie (Verstraete et al., 2012). Une récente méta-analyse d'études IRM a montré une réduction significative de la matière grise dans le gyrus précentral droit et dans le cortex frontal inférieur bilatéral (Shen et al., 2016). D'autre part, la perte de matière blanche au niveau du corps calleux est régulièrement retrouvée chez les patients SLA (Filippini et al., 2010). Des études de spectrométrie par résonance magnétique ont permis de mettre en lumière les altérations de certaines molécules. Chez les patients SLA, il existe une réduction marquée de N-acétyl aspartate par rapport à la choline et à la créatine dans le cortex moteur et tout le long du TCS (Pyra et al., 2010; Sivak et al., 2010). De plus, ces taux diminuent avec l'avancée de la maladie selon un suivi longitudinal (Unrath et al., 2007). Ces altérations traduisent une souffrance des neurones et une neurodégénérescence progressive (Atassi et al., 2017). Le GABA semble diminué dans le cortex moteur de patients SLA (Foerster et al., 2014), et le glutamate est retrouvé parfois augmenté, (Han and Ma, 2010; Piro et al., 1999), parfois diminué (Atassi et al., 2017; Bowen et al., 2000) (Figure 16).

L'environnement cortical est aussi sujet au changement, notamment à cause de la présence d'un phénomène de neuroinflammation. Des études histopathologiques ont montré que les cellules de Betz étaient anormalement entourées de cellules gliales réactives, notamment autour des dendrites apicales (Hammer et al., 1979; Nagy et al., 1994; Troost et al., 1992). En plus de cette action locale, il existe une neuroinflammation plus diffuse, touchant l'ensemble du cortex primaire mais aussi de zone non motrice comme le cortex préfrontal. En effet, des études de tomographie par émission de positons utilisant des marqueurs spécifiques des microglies et des astrocytes ont pu montrer leurs activations respectives, même à des stades de début de maladie (Corcia et al., 2012; Turner et al., 2004; Zurcher et al., 2015). Une étude récente a montré que l'activation gliale accompagne les lésions corticales (Alshikho et al., 2016).

Au sein du cortex, on observe de nombreuses altérations des interneurones, pouvant être accompagnées de la perte d'une ou plusieurs populations interneuronales. L'observation des marquages parvalbumine, calbindine et somatostatine, caractéristiques de certaines sous-populations d'interneurones ont montré une nette perte dans le cortex cérébral en post-mortem (Maekawa et al., 2004; Nihei et al., 1993). La baisse des niveaux de GABA corticaux (Foerster et al., 2012) et la baisse de l'expression du gène encodant la sous-unité alpha 1 du

récepteur GABA<sub>a</sub> (Petri et al., 2006; Petri et al., 2003) confirme la perte de des populations d'interneurones.



**Figure 16 : Atteintes des centres supraspinaux chez les patients SLA.** Résumé des principales atteintes au niveau cortical et sous cortical chez les patients SLA, démontré par des techniques d'imagerie fonctionnelles (cadres rouges) et structurales (cadres bleus). (Adaptation de (Chiò et al., 2014)).

La reconstruction du connectome des patients SLA par imagerie en tenseur de diffusion a permis de mettre en évidence une atteinte des réseaux neuronaux dans les régions motrices primaires et secondaires ainsi que dans les régions avoisinantes (Verstraete et al., 2011). Le suivi longitudinal des patients a quant à lui montré une altération progressive au cours du temps de la structuration du connectome. Les régions motrices sont les premières altérées puis s'en suit les régions où projettent les neurones des régions motrices comme les lobes frontaux et pariétaux (Verstraete et al., 2014a). L'observation longitudinale de l'intégrité des tractus a montré une altération séquentielle des différents tractus émanant du cortex (Kassubek et al., 2014). L'analyse des réseaux de repos par IRM fonctionnelle a révélé une augmentation de la connectivité fonctionnelle chez les patients symptomatique dans les réseaux impliquant les aires sensorimotrices, somatosensorielles et le réseau cortico-striatal (Agosta et al., 2014; Agosta et al., 2010; Fekete et al., 2013) L'augmentation de la connectivité pourrait être un mécanisme compensatoire intervenant aux premiers stades de la maladie

(Agosta et al., 2018). En effet, une augmentation de la connectivité fonctionnelle a été détectée dans des réseaux moteur chez des porteurs de mutations et des patients dans les premiers stades de la maladie (Schulthess et al., 2016). La tomographie par émission de positrons au 18F-fluorodésoxyglucose a permis d'étudier le métabolisme du glucose dans le cerveau des patients SLA et de montrer un hypo-métabolisme dans le cortex moteur et un hyper-métabolisme dans d'autres régions motrices comme le tronc cérébral et le cervelet (Pagani et al., 2014; Van Laere et al., 2014).

Dans leur ensemble, les altérations du cortex moteur révélées par l'imagerie structurelle et fonctionnelle corrélient avec l'évolution clinique des patients, et ce, de manière précoce (Agosta et al., 2018).

## 2.2 Chez la souris

Pour des raisons techniques, il est plus difficile d'étudier le cortex cérébral et ses altérations chez la souris. Néanmoins, de nombreuses études ont pu montrer que les souris modélisant la SLA sont capables de récapituler les altérations présentes chez les patients.

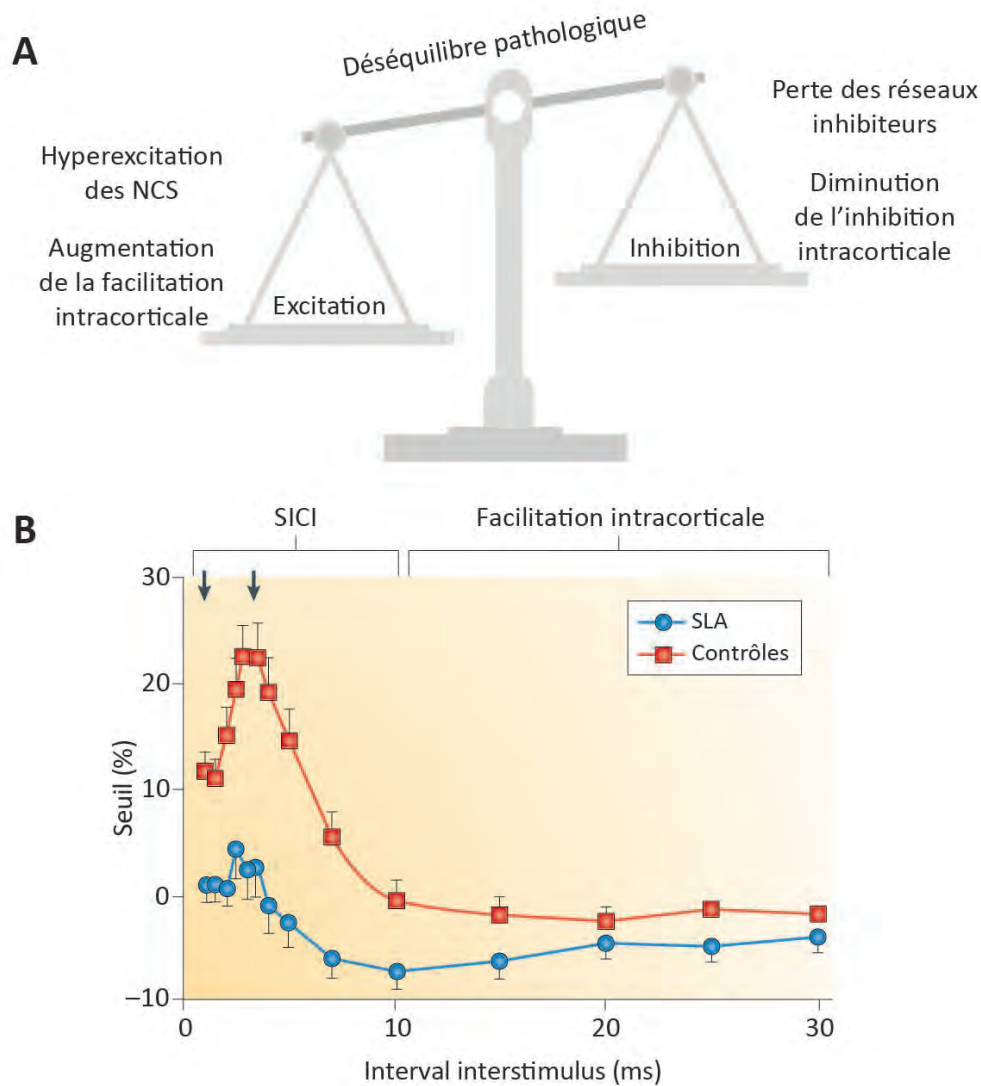
Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, le poids global du cerveau est réduit au stade terminal de la maladie mais l'épaisseur corticale n'a jamais été analysée (Zang and Cheema, 2002). Une étude en IRM structurale a permis de mettre en évidence une perte du volume du cortex sensorimoteur, du striatum et de la capsule interne chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Petrik et al., 2007). Une étude récente a pu tester l'intégrité des tractus chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* par imagerie en tenseur de diffusion. Les auteurs ont montré des anomalies dans l'organisation des axones dans le corps calleux, le cortex moteur et l'hippocampe à des âges présymptomatiques (Gatto et al., 2019). Ces altérations ont également été confirmées en histologie dans la même étude (Gatto et al., 2019). Les études du connectome chez la souris sont difficilement réalisables. Cependant, l'utilisation de virus rétrograde permet la quantification des projections d'une structure à un instant t. Cette technique a mis en évidence une augmentation des projections du cortex somatosensoriel vers le cortex moteur primaire à des âges présymptomatiques chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*. Avec l'avancement de la maladie, les projections du thalamus, du cortex auditif, et du cortex moteur primaire contralatéral augmentent vers le cortex moteur primaire (Commisso et al., 2018). Ces résultats vont dans le sens de ceux trouvés chez les patients SLA.

Les altérations du système inhibiteur cortical et des interneurons sont retrouvées dans plusieurs modèles murins de SLA. En effet, les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* récapitulent la perte des interneurons inhibiteurs exprimant la calrétinine dans les couches supérieures du cortex au stade symptomatique (Clark et al., 2017). De manière intrigante, on observe chez ces animaux, une diminution des interneurons inhibiteurs exprimant le neuropeptide Y lors de l'apparition des symptômes suivie d'une augmentation au stade final de la maladie (Clark et al., 2017). L'analyse électrophysiologique des caractéristiques des interneurons de souris *SOD1<sup>G93A</sup>* en culture a montré une réduction de leur excitabilité et une diminution de la complexité des neurites ainsi qu'une morphologie anormale (Clark et al., 2018). Chez les souris *TDP-43<sup>A315T</sup>*, on observe une diminution du nombre de synapses GABAergiques sur les neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur (Zhang et al., 2016). De plus, dans ce modèle les interneurons exprimant la somatostatine sont hyperactivés et les interneurons exprimant la parvalbumine sont hypoactivés (Zhang et al., 2016). La dérégulation des interneurons conduit alors à la dérégulation de la balance excitation/inhibition corticale et participe au phénomène d'hyperexcitabilité.

### **2.3 Hyperexcitabilité corticale**

D'un point de vue électrophysiologique, l'hyperexcitabilité corticale se définit comme une réponse augmentée ou exagérée face à un stimulus qui aurait dû provoquer une réponse dite normale (Bae et al., 2013). L'hyperexcitabilité corticale est une marque pathologique que l'on retrouve chez quasiment tous les patients SLA, qu'il s'agisse de cas familiaux (*SOD1*, *FUS*, *C9ORF72*) ou sporadiques (Blair et al., 2010; Mills and Nithi, 1997; Vucic et al., 2008; Williams et al., 2013). En clinique, l'hyperexcitabilité corticale est généralement mesurée par stimulation magnétique transcrânienne (SMT). Cette technique permet de tester l'intégrité des circuits neuronaux corticaux facilitateurs et/ou inhibiteurs en stimulant le cortex moteur et en enregistrant les réponses musculaires par des électrodes de surface (Wagle-Shukla et al., 2009). Parmi les composantes inhibitrices qui influencent l'excitabilité corticale, il existe l'inhibition intracorticale à courte latence (ou SICI pour short-interval intracortical inhibition). Chez les patients SLA, cette composante est fortement réduite, impliquant que le seuil pour déclencher un événement moteur est réduit. Cette altération est déjà présente chez les porteurs de mutations *SOD1* asymptomatiques, suggérant une mise en place précoce de

l'hyperexcitabilité (Menon et al., 2015; Vucic and Kiernan, 2006; Williams et al., 2013) (Figure 17)



**Figure 17 : L'hyperexcitabilité corticale dans la SLA. A)** Un déséquilibre pathologique de la balance excitation/inhibition se produit dans le cortex des patients SLA. Le cortex cérébral devient hyperexcitable suite à plusieurs dérégulations. **B)** La perte de l'inhibition corticale enregistrée par stimulation transcrânienne met en évidence les défauts du système inhibiteur GABAergique présent chez les patients SLA. Abréviations : NCS : neurones corticospinaux ; SICI : inhibition intracorticale à intervalle court. (Adaptation de (Geevasinga et al., 2016)).

Les mécanismes sous-jacents de l'hyperexcitabilité corticale ne sont pas encore bien connus. Néanmoins, plusieurs mécanismes ont été avancés. Les interneurons inhibiteurs, notamment GABAergiques jouent un rôle essentiel dans le maintien de la balance

excitation/inhibition au niveau du cortex. Ils interviennent notamment dans le phénomène de SICI, qui est réduit chez les patients SLA. Le système inhibiteur cortical est fortement altéré aussi bien chez les patients que dans les modèles animaux, avec notamment une perte des interneurons et plusieurs preuves de leurs dysfonctionnements (Turner and Kiernan, 2012). Ces perturbations des circuits inhibiteurs pourraient conduire à une perte de l'inhibition corticale et favoriserait donc l'hyperexcitabilité observée (Bae et al., 2013; Do-Ha et al., 2018). Une étude récente chez l'Homme suggère que l'hyperexcitabilité proviendrait du dysfonctionnement d'interneurones inhibiteurs de premier ordre en plus d'une activité accrue des interneurons inhibiteurs de second ordre, induisant finalement une désinhibition des NCS (Van den Bos et al., 2018). Cette étude a également montré pour la première fois une augmentation des circuits de facilitations qui peuvent augmenter l'activité électrique des NCS. Cette étude suggère donc une plus large perturbation de la balance excitation/inhibition conduisant à l'hyperexcitabilité (Van den Bos et al., 2018).

A l'heure actuelle, aucune étude n'a testé l'hyperexcitabilité corticale dans les modèles animaux. Néanmoins, au laboratoire, des études préliminaires ont montré que les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* présentent une hyperexcitabilité corticale et ce également de manière précoce à des stades présymptomatiques.

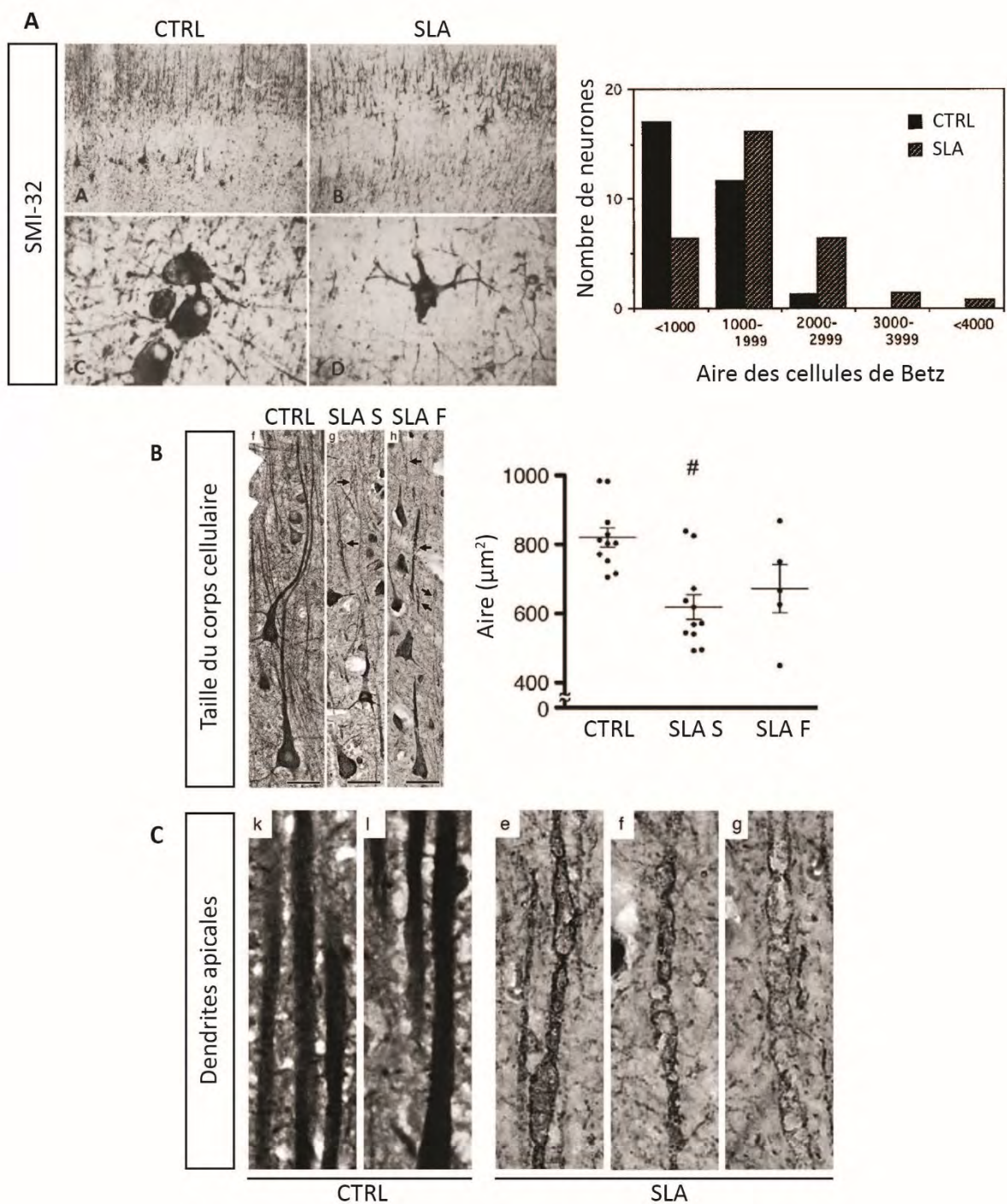
### **3. Dégénérescence et altérations des NCS**

#### **3.1 Chez les patients SLA**

Charcot était le premier à montrer des lésions corticales et à mettre en évidence la perte des NCS au sein du cortex moteur. Plus récemment, des analyses post-mortem de cerveaux de patients SLA sont venues confirmer, avec d'autres techniques, la perte des NCS dans la couche V (Hammer et al., 1979; Mochizuki et al., 1995; Nihei et al., 1993; Sasaki and Iwata, 1999b).

Les études histopathologiques sur les NCS sont rares et se concentrent généralement sur les cellules de Betz qui sont des neurones pyramidaux géants, une sous population de NCS. En plus de leur dégénérescence, de nombreuses altérations morphologiques ont été décrites sur les neurones encore présent dans la couche V du cortex des patients SLA (Figure 18).





**Figure 18 : Atteintes histopathologiques des neurones corticospinaux chez les patients SLA.**

**A)** L'examen post mortem de cerveau de patients SLA montre une perte importante des cellules de Betz dans la couche V du cortex moteur, révélée par un marquage immunohistochimique SMI-32. **B)** Ce sont surtout les cellules ayant une aire importante qui dégénèrent et celles restantes ont un soma plus petit. **C)** Les dendrites apicales sont fortement endommagées chez les patients SLA et présentent d'importante vacuoles. (Résultats tirés de (Nihei et al., 1993; Genc et al., 2017)).



En effet, les NCS restant sont atrophiés et le diamètre de leur corps cellulaire est réduit (Genc et al., 2017; Hammer et al., 1979; Kiernan and Hudson, 1991). En plus de la dégénérescence des axones présents dans le tractus corticospinal (Murayama et al., 1992; Tsuchiya et al., 2002), les NCS perdent également leurs dendrites apicales et le nombre d'épines dendritiques est fortement diminué (Genc et al., 2017; Nihei et al., 1993). La présence de vacuoles le long des dendrites apicales (Genc et al., 2017) et de changements au sein même des dendrites, mis en évidence par la présence d'agrégats formés de mitochondries et de vésicules (Sasaki and Maruyama, 1994), pointent les nombreux dysfonctionnements des cellules de Betz (Figure 18). Toujours au niveau intracellulaire, on retrouve également plusieurs types d'inclusions cytoplasmiques pathologiques positives pour TDP-43, ubiquitine, neurofilaments phosphorylés, P62 (Braak et al., 2017; Brettschneider et al., 2013a; Murayama et al., 1992; Troost et al., 1992). Ces études tendent à montrer qu'au sein du cortex, les NCS souffrent et perdent leurs fonctionnalités et leurs connexions. En effet, c'est dans les dendrites apicales que les cellules de Betz intègrent et modulent les informations qu'elles reçoivent de la part de neurones projetant depuis le thalamus, l'hémisphère controlatéral ou provenant de circuits locaux. Ces modifications ont de nombreuses conséquences sur l'intégrité de l'ensemble de ces circuits (Dervishi and Ozdinler, 2018).

### 3.2 Chez la souris

Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, trois études ont montré une perte progressive et précoce des NCS et de leurs axones, par marquage rétrograde depuis le funicule dorsal de la moelle épinière (Ozdinler et al., 2011; Yasvoina et al., 2013; Zang and Cheema, 2002). Des résultats similaires ont été obtenus grâce au croisement génétique des souris *SOD1<sup>G93A</sup>* et *UCL1-eGFP* qui expriment le gène de l'eGFP sous le contrôle du promoteur du gène de l'ubiquitine carboxy-terminal hydroxylase L1 (UCL1), permettant le marquage spécifique des neurones pyramidaux excitateurs de la couche V du cortex cérébral (Yasvoina et al., 2013). Deux techniques différentes ont donc pu mettre en évidence la dégénérescence des NCS chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*. D'autres modèles surexprimant des mutations différentes ont également été étudiés. C'est le cas des souris *TDP-43A<sup>315T</sup>* où l'on observe une perte des NCS dès le début de la phase symptomatique (Handley et al., 2017). Chez les souris *PFN1<sup>G118V</sup>*, une étude a montré la perte des neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur (Fil et al., 2017). Enfin,

chez les souris *C9ORF72-BAC*, les larges neurones pyramidaux dégénèrent au cours de la maladie (Chew et al., 2015; Liu et al., 2016). Toutes ces études montrent que la perte des NCS se retrouvent dans différents modèles murins, et sont donc pertinents pour l'étude de la SLA.

Certaines études sont allées plus loin dans la caractérisation histopathologique des NCS. Tout comme chez les patients SLA, on retrouve une dégénérescence du tractus corticospinal accompagné d'une perte des dendrites apicales et une diminution des épines dendritiques des NCS avec la présence de vacuoles chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* (Fogarty et al., 2016a; Fogarty et al., 2016b; Fogarty et al., 2015; Jara et al., 2012; Ozdinler et al., 2011; Yasvoina et al., 2013). De manière très intéressante, chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* et *TDP-43<sup>Q331K</sup>*, les changements morphologiques observés au niveau des dendrites et des épines dendritiques sont des évènements très précoces qui arrivent bien avant l'apparition des premiers symptômes (Fogarty et al., 2016a; Fogarty et al., 2016b; Handley et al., 2017; Jara et al., 2012; Ozdinler et al., 2011). Les souris *TDP-43<sup>A35T</sup>* présentent une accumulation d'inclusions cytoplasmiques positives pour l'ubiquitine dans les neurones de la couche V du cortex moteur, avec une altération des dendrites apicales, entourées d'une astrogliose et d'une microgliose. Ces études confirment également la perte des NCS et la dégénérescence du tractus corticospinal (Handley et al., 2017; Herdewyn et al., 2014; Jiang et al., 2019; Wegorzewska et al., 2009; Zhang et al., 2016). Enfin, chez les souris *PFN1<sup>G118V</sup>*, la perte des NCS est accompagnée d'une vacuolisation des dendrites et d'une pathologie TDP-43 (Fil et al., 2017).

Au laboratoire, dans une étude à laquelle j'ai participé, nous avons montré que chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, les NCS dégénèrent progressivement le long de l'axe rostro-caudal en commençant par les régions les plus caudales puis en progressant vers les régions plus rostrales (Marques et al., 2019b). Chez la souris, les régions caudales projettent vers les membres postérieurs, or chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, les premiers symptômes moteurs ont lieu dans cette partie du corps. Ainsi, chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* il existe, comme chez les patients SLA, une relation somatotopique entre les altérations motrices et la dégénérescence des NCS et des MN (Marques et al., 2019b). De plus, cette perte initiale intervient dès 60 jours lorsque les souris sont encore asymptomatiques. Ainsi, la dégénérescence des NCS précède la perte de poids à 75 jours, la dénervation à 90 jours et la perte des MN au stade terminal de la maladie. Ces résultats inédits dans un modèle murin de SLA suggèrent une dégénérescence antérograde ayant pour origine le cortex moteur (Marques et al., 2019b). Les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*

représentent donc un modèle pertinent pour étudier la contribution des NCS dans la SLA (Figure 13).

#### **4. Syndrome pyramidal et spasticité**

Une perte des NCS ou une lésion du tractus corticospinal induit un ensemble de symptômes et de signes cliniques regroupés sous le terme de syndrome pyramidal. On y distingue des signes négatifs et des signes positifs. Les signes négatifs reflètent ce qui est perdu et la sous activation des muscles induisant une parésie. En clinique, on observe ainsi une perte de la dextérité, de la force, de la coordination et du contrôle moteur. Les signes positifs traduisent une activité musculaire anormalement élevée induisant des mouvements involontaires. On observe une augmentation des réflexes cutanés (signe de Babinski), des spasmes, une hyperréflexie, une dystonie et de la spasticité. L'ensemble de ses symptômes et signes cliniques peuvent cohabiter chez les patients SLA et se retrouvent dans d'autres maladies comme la sclérose en plaque, les lésions de la moelle épinière et les accidents vasculaires cérébraux (Bhimani and Anderson, 2014; Segal, 2018; Sheean and McGuire, 2009).

La spasticité est une composante du syndrome pyramidal parmi plusieurs autres. Cependant, sa définition est souvent utilisée de manière générique pour décrire les autres signes positifs du syndrome pyramidal. Il est donc important de bien définir ce qu'est la spasticité. La définition généralement acceptée est celle de Lance (1980) qui définit la spasticité comme étant « un désordre moteur caractérisé par une augmentation vitesse dépendante du réflexe tonique d'étirement (tonus musculaire) avec une exagération des réflexes ostéotendineux, résultant d'une hyperexcitabilité du réflexe d'étirement et qui est une des composantes du syndrome pyramidal » (Lance, 1980). Cette définition a le mérite d'être juste mais néanmoins imprécise car elle ne tient pas compte de l'aspect sensoriel de la spasticité. En effet, les troubles spastiques sont dus à l'altération du traitement de l'information sensorielle au sein de la moelle épinière et non pas à des changements musculaires. De plus, cette définition engendre des confusions avec les autres signes du syndrome pyramidal. Il faut distinguer la rigidité de la spasticité car la rigidité ne dépend pas de la vitesse. Les spasmes sont des tremblements involontaires et doivent aussi être distingués. Il est également important de noter que dans certaines conditions, les patients spastiques n'ont pas d'hyperréflexie. Pour chaque question scientifique ou clinique, il est donc

important de bien définir la spasticité (Bhimani and Anderson, 2014; Nielsen et al., 2007; Sheean and McGuire, 2009; Sinkjaer et al., 1993; Trompetto et al., 2014).

La spasticité est une manifestation clinique qui s'installe progressivement chez les patients atteints de SLA. Ce phénomène neurologique est intrinsèquement variable. Ainsi, le degré de spasticité peut varier au cours de la journée chez un même individu, il dépend de l'activité, de la fatigue et des habitudes du patients. La spasticité reste donc très difficilement quantifiable. Elle reflète les changements plastiques des réseaux de neurones et d'interneurones de la moelle épinière, après une lésion de la moelle épinière et/ou une perte des contrôles moteurs supérieurs. La spasticité interfère avec les fonctions motrices résiduelles et peut induire de fortes douleurs. Parmi les signes et symptômes du syndrome pyramidal, elle est la seule composante à pouvoir être traitée. Cependant, dans certains cas de pertes motrices importantes, elle peut faciliter la marche et certains mouvements en maintenant l'activité motrice. Pour cela, elle n'est pas systématiquement traitée et requiert un dialogue et une évaluation constante avec le patient.

#### **4.1 Pathophysiologie de la spasticité**

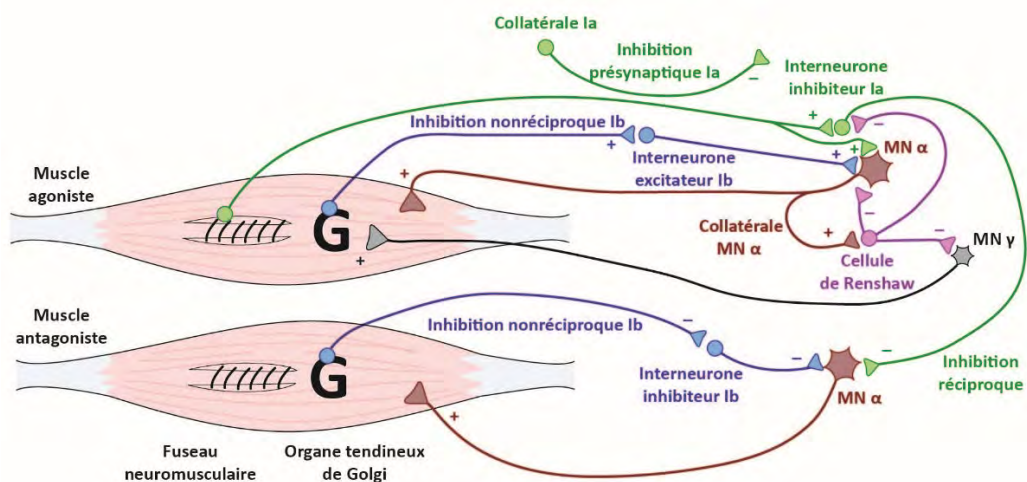
L'établissement de la spasticité combine les perturbations des influences spinales et supraspinales sur les MN ainsi que les changements intrinsèques aux MN. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la pathophysiologie de la spasticité dont les causes sont sûrement multiples.

##### **4.1.1. Influences spinales sur les MN**

Le réflexe d'étirement est modulé par une connexion excitatrice entre les fibres la provenant du fuseau neuromusculaire et les MN permettant ainsi l'excitation de ce dernier et la contraction du muscle en réponse à son étirement. Dans le cadre de la spasticité, les fibres la seraient hyperexcitables et conduiraient à une activation anormale des MN et une augmentation de la contraction musculaire. Cependant, aucune preuve de décharge plus importante des fibres la n'a jamais pu être trouvée (Nielsen et al., 2007; Wilson et al., 1999a; Wilson et al., 1999b).

Différentes voies réflexes conduisant à l'inhibition des MN peuvent se retrouver diminuées chez les patients spastiques et ainsi conduire à l'hyperexcitabilité des MN (D'Amico

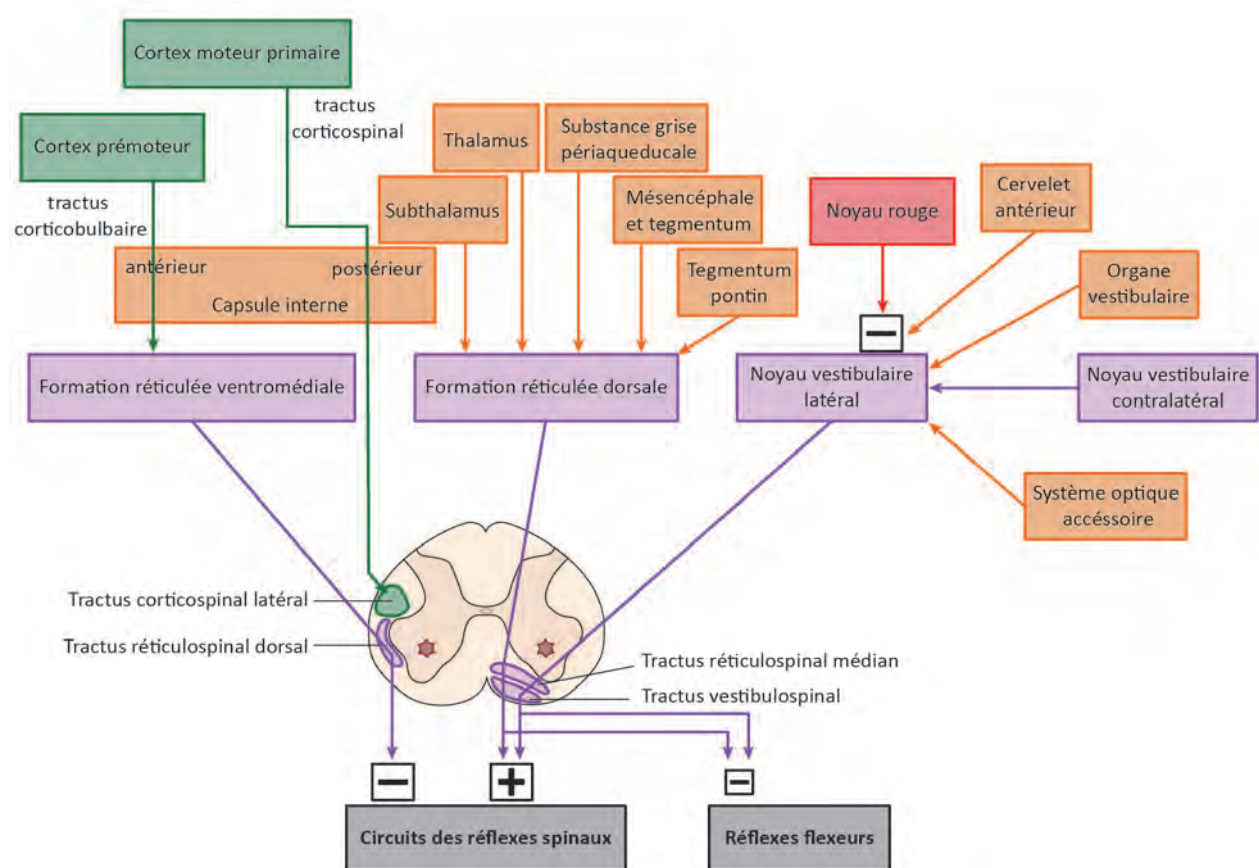
et al., 2014; Nielsen et al., 2007) (Figure 19). On retrouve réduit chez les patients spastiques l'inhibition présynaptique des fibres Ia qui permet de réduire leurs potentiels postsynaptiques excitateurs et donc de réduire leur pouvoir excitateur sur les MN. (Faist et al., 1994; Katz, 1999; Nielsen et al., 1995). L'inhibition réciproque Ia, qui assure que le muscle antagoniste soit relâché quand le muscle agoniste, est contracté est également diminuée (Crone et al., 2003; Crone et al., 1994). Les patients ayant une parapésie progressive ou une SLA ont une diminution de l'inhibition récurrente qui est médiée par les cellules de Renshaw qui reçoivent des collatérales excitatrices des MN et projettent directement sur ces mêmes MN ainsi que sur les interneurones Ia. En revanche cela n'a pas été montré dans d'autres cas de spasticité (Mazzocchio and Rossi, 1997; Raynor and Shefner, 1994). On constate chez les patients spastiques une diminution de l'inhibition autogénique Ib qui est activée par les fibres Ib provenant de l'organe tendineux de Golgi et médiée par les interneurones Ib qui projettent sur les MN du même muscle (Gossard et al., 1994; Wargon et al., 2006). La dépression post-activation est une diminution des neurotransmetteurs libérés par les fibres Ia après plusieurs stimulations répétées. Chez les patients ce phénomène est diminué et permet une surstimulation des MN (Trompetto et al., 2013) (Figure 19).



**Figure 19 : Influences spinales sur l'excitabilité des motoneurones.** De nombreux circuits locaux dans la moelle épinière vont réguler l'activité des motoneurones (MN). La cellule de Renshaw et les interneurones inhibiteurs et excitateurs sont aux cœurs de ces circuits. Leurs projections viennent directement inhiber ou exciter les MN. (Adaptation de (Segal et al., 2018)).

#### 4.1.2. Influences supraspinales sur les MN

Plusieurs voies descendantes modulent l'excitabilité des MN et peuvent faciliter ou inhiber les réflexes spinaux. Les MN sont notamment sous le contrôle inhibiteur de la formation réticulée ventromédiane qui projette *via* le tractus réticulospinal dorsal. Cette structure est sous le contrôle excitateur du cortex prémoteur, *via* les fibres corticobulbaire (Magoun and Rhines, 1946). Les MN sont également sous le contrôle excitateur de la formation réticulée dorsale et du noyau vestibulaire latéral qui projettent respectivement *via* le tractus réticulospinal ventral et le tractus vestibulospinal (Segal, 2018; Trompetto et al., 2013) (Figure 20).



**Figure 20 : Influences supraspinales sur les réflexes de la moelle épinière.** De nombreuses influences supraspinales descendantes régulent les circuits spinaux locaux et les motoneurones qui *in fine* modifient les réflexes. La formation réticulée ventromédiane a une influence inhibitrice sur les circuits des réflexes spinaux tandis que la formation réticulée dorsale et le noyau vestibulaire latéral ont des influences excitatrices. De plus ces deux dernières structures ont aussi des influences inhibitrices sur les réflexes des extenseurs. Le noyau rouge permet d'inhiber le noyau vestibulaire latéral (Adaptation de (Segal et al., 2018)).

L'observation de patients ayant eu des AVC localisés au niveau du système pyramidal, précisément aux pyramides bulbaires (Bucy et al., 1964) et aux pédoncules cérébraux (Sherman et al., 2000) montre qu'ils ne présentent pas de spasticité. L'atteinte unique du NCS n'est donc pas capable d'engendrer de la spasticité (Trompetto et al., 2014). En revanche, lorsque les lésions sont localisées au niveau des voies corticobulbaire, réticulospinale et vestibulospinale, l'équilibre excitation/inhibition dans la moelle épinière est perturbé et cela induit de la spasticité (Segal, 2018; Trompetto et al., 2013). L'inclusion de la spasticité dans le syndrome pyramidal peut donc porter à confusion puisque les fibres corticospinales semblent n'avoir que peu de contribution dans l'établissement de la spasticité. Du moins, aucune n'étude n'a pu prouver leur implication.

Les MN sont aussi sous l'influence de contrôles monoaminergiques provenant du tronc cérébral qui ont un effet excitateur. Suite à une lésion de la moelle épinière, des études ont montré que la perte des monoamines telles que la sérotonine et la noradrénaline contribue et renforce la spasticité. Dans un premier temps, la perte des monoamines réduit l'excitabilité des MN. Mais dans un second temps, les MN deviennent hypersensibles aux monoamines résiduelles et leurs récepteurs peuvent s'auto activer, ce qui entraîne une hyperexcitabilité des MN (D'Amico et al., 2014; Murray et al., 2010; Murray et al., 2011; Rank et al., 2011).

#### **4.1.3. Changements intrinsèques aux MN**

Certains changements pathophysiologiques intrinsèques aux MN peuvent conduire au développement de la spasticité. Ces changements passent généralement par la modulation de l'activité électrique des MN. Il a été montré dans les modèles animaux que les courants persistant entrant sont chroniquement activés dans les MN après lésions de la moelle épinière. L'activation de ces courants permet aux MN de décharger de manière prolongée. En amplifiant et prolongeant l'activité des MN, ils conduisent au phénomène de spasticité (Heckmann et al., 2005; Li et al., 2007; Li and Bennett, 2003; Murray et al., 2010). Les canaux KCC2 participent à l'équilibre en chlore et jouent sur l'excitabilité des MN. Il a été montré que suite à des lésions de la moelle épinière, leur expression était fortement diminuée au niveau des MN, favorisant l'apparition de la spasticité (Boulenguez et al., 2010).

## 4.2 Traitement de la spasticité

La spasticité est un symptôme invalidant et les contractions musculaires engendrées peuvent être très violentes et très douloureuses. L'objectif du traitement de la spasticité est de limiter les conséquences fonctionnelles occasionnées et d'augmenter au maximum le confort du patient. Les traitements de la spasticité incluent des thérapies manuelles physiques, des approches médicamenteuses et dans de rares cas, des interventions chirurgicales (Smania et al., 2010; Strommen, 2013; Thibaut et al., 2013).

L'intervention d'un kinésithérapeute a pour but de prévenir l'apparition des contractures en réalisant des étirements (Bovend'Eerd et al., 2008; Watanabe, 2004). Le renforcement musculaire peut également être préconisé mais aucune preuve de son efficacité n'existe (Thibaut et al., 2013). En complément de ces méthodes, l'utilisation de traitements pharmacologiques est nécessaire, mais il n'existe pas de consensus et ces molécules possèdent beaucoup d'effets secondaires centraux et périphériques avec souvent une forte toxicité hépatique (Smania et al., 2010; Thibaut et al., 2013). Parmi les molécules agissant au niveau central, la plus répandue est le Baclofen, un agoniste du GABA ayant une affinité spécifique au récepteur GABA<sub>b</sub>. Il réduit la spasticité en augmentant les influences inhibitrices dans la moelle épinière, notamment en augmentant l'inhibition présynaptique et en hyperpolarisant les fibres Ia (Hulme et al., 1985). Des benzodiazépines comme le diazépam ou le clonazépam peuvent être utilisés car ce sont des agonistes GABA<sub>A</sub> qui agissent sur la formation réticulée et les circuits locaux de la moelle épinière. Ainsi, ils augmentent l'inhibition présynaptique (Tseng and Wang, 1971). Il a été également proposé d'utiliser la Gabapentine qui possède une structure proche de celle du GABA. Elle réduirait la spasticité mais ses mécanismes d'actions ne sont pas encore compris (Formica et al., 2005). La tizanidine est un dérivé de l'imidazoline qui agit sur les récepteurs adrénergiques  $\alpha_2$ . Elle bloque la libération du glutamate et facilite la transmission glycinergique. Elle permet l'augmentation de l'inhibition présynaptique (Gelber et al., 2001). Une autre molécule utilisée agissant cette fois-ci au niveau périphérique est le Dantrolène. Cet agent se lie aux récepteurs musculaires à la ryanodine et bloque ainsi la sortie du calcium des réticulums sarcoplasmiques. Le Dantrolène empêche donc la contraction musculaire et relaxe les muscles (Zhao et al., 2001).

Des traitements réalisés par voie intramusculaire permettent de diminuer la spasticité de manière locale. L'injection de phénol et d'alcool, des agents neurolytiques, induit une dénervation chimique des axones des MN (Elovic et al., 2009) tandis que l'injection de toxine



botulique inhibe le relargage d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire (Burbaud et al., 1996; McCrory et al., 2009). Ces substances permettent d'avoir une relaxation des muscles sans avoir les effets secondaires centraux. La stimulation électrique nerveuse transcutanée des muscles spastiques permet de réduire les symptômes. Cela interviendrait par la sécrétion d'endorphines qui réduirait l'excitabilité des MN. Cette technique nécessite encore des études plus approfondies (Sahin et al., 2012; Thibaut et al., 2013).

Dans certains cas plus rares, les patients spastiques peuvent être amenés à subir une intervention neurochirurgicale visant à diminuer la contraction musculaire, de manière irréversible et définitive (Thibaut et al., 2013).

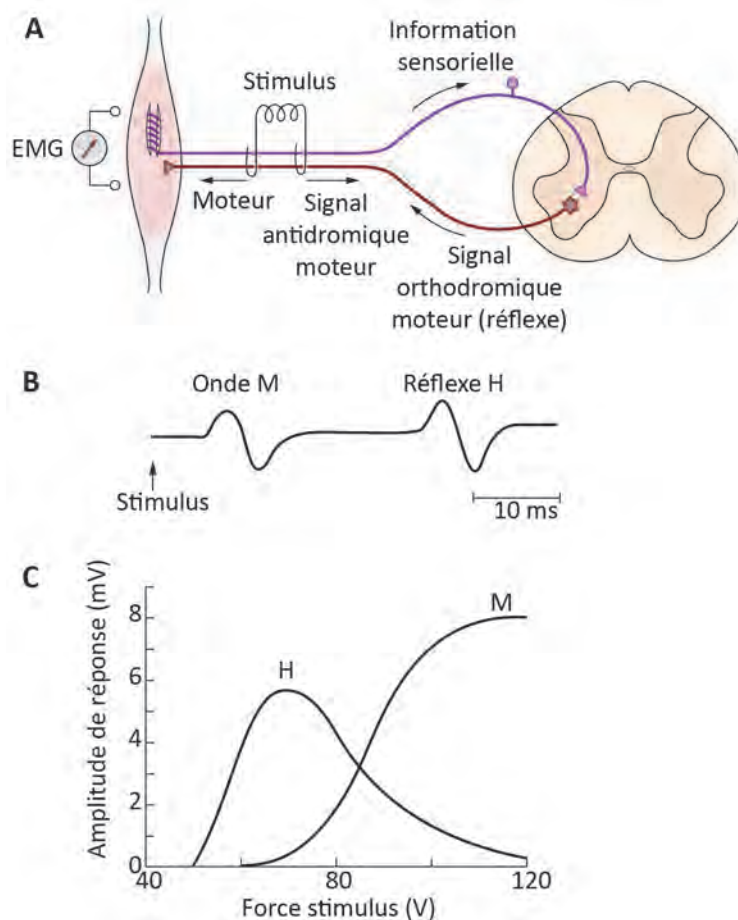
### **4.3 Diagnostic de la spasticité**

Il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus sur les méthodes de diagnostic de la spasticité. Les tests reposent sur des investigations biomécaniques et sur l'utilisation de mesures électrophysiologiques (Aloraini et al., 2015; Biering-Sorensen et al., 2006; Thibaut et al., 2013).

Deux échelles sont principalement utilisées pour le diagnostic de la spasticité. L'échelle d'Ashworth et les modifications qui y ont été apportées mesurent le niveau de résistance à un étirement lors d'un mouvement passif (Bohannon and Smith, 1987). C'est l'échelle la plus utilisée, car elle est simple, rapide et ne nécessite pas d'instrument. Cependant, elle reste très fortement critiquée car elle ne tient pas compte de la vitesse du mouvement et dépend de l'expérimentateur car la mesure est subjective. L'échelle de Tardieu prend en compte la vitesse du mouvement dans sa mesure de la résistance à l'étirement et considère l'angle de l'articulation lors du mouvement (Haugh et al., 2006). Cette échelle est également critiquée pour son manque d'objectivité, de fiabilité et sa variabilité d'un examinateur à l'autre. Une autre méthode biomécanique est le test du pendule de Wartenberg (Bajd and Vodovnik, 1984). Dans ce test, les pieds du patient sont dans le vide et l'examineur redresse la jambe à l'horizontale puis la jambe est relâchée et retombe sous l'effet de la gravité. On tient alors compte de la vitesse et de l'angle des articulations.

Ces mesures cliniques sont généralement complétées avec des tests électrophysiologiques qui mesurent l'activation des réflexes et leurs composantes. Les électromyogrammes (EMG) peuvent enregistrer l'activité électrique des muscles en réponse à un stimulus électrique (Réflexe-H, F-Wave), en réponse à un stimulus mécanique (Réflexe-

T) et la réponse à un mouvement passif ou actif (réflexe d'étirement, test du pendule) (Voerman et al., 2009). La mesure du réflexe d'Hoffmann (Réflexe-H) est le test le plus communément utilisé pour le diagnostic de la spasticité (Figure 21). Ce réflexe spinal est induit par la stimulation électrique du nerf mixte périphérique. Cette stimulation provoque une impulsion qui traverse les fibres Ia et remonte jusqu'à la synapse avec le MN qui est alors activé et permet une contraction musculaire. C'est l'onde H (Angel, 1963; Jabre, 1981). Il y a également une onde M qui résulte de l'activation directe des MN lors de la stimulation du nerf. Les paramètres enregistrés, qui varient chez un patient spastique sont la latence, l'amplitude et le ratio H/M. Le réflexe-H reflète les changements d'inhibition et d'excitation des MN. Ainsi dans un muscle spastique l'onde H aura une latence plus faible et une amplitude plus élevée (Voerman et al., 2009) (Figure 21). Il n'en demeure pas moins que les méthodes électrophysiologiques ont également une certaine variabilité dans leurs mesures. Plusieurs paramètres peuvent influencer les enregistrements comme la position du patient, le placement des électrodes, les paramètres de stimulation, l'activité musculaire basale etc.



**Figure 21 : Le réflexe d'Hoffmann. A)** Le réflexe d'Hoffmann (réflexe H) est évoqué par la stimulation électrique des fibres sensorielles Ia depuis le faisceau neuromusculaire. Ces fibres

vont exciter le motoneurone alpha, qui en retour va activer la contraction musculaire. L'activation du muscle est alors détectée par électromyographie (EMG). **B)** Lors d'un stimulus de force intermédiaire dans un nerf mixte, les fibres motrices et sensibles sont excitées. Cela conduit à la production d'une onde M résultante de l'activation des motoneurones alpha suivit d'une onde H qui est le réflexe produit par l'activation des fibres Ia. **C)** Les amplitudes des ondes M et H dépendent de l'intensité du stimulus. L'onde H est maximale lorsque l'onde M est faible. (Adaptation de (Kandel et al., 2012)).

Le diagnostic de la spasticité est relativement aisé, cependant il est difficile d'évaluer le degré d'atteinte et son évolution dans le temps. Les méthodes biomécaniques et électrophysiologiques ne corrèlent que très peu entre elles. Le manque de sensibilité et les grandes variations restreignent le diagnostic à positif ou négatif, sans que l'on ait une quantification (Voerman et al., 2009).

#### **4.4 Spasticité et SLA**

La spasticité est un symptôme qui se retrouve chez 1/3 des patients SLA, à divers stades de la maladie, et demeure cliniquement très difficile à mettre en évidence et peut même être absente dans les muscles faibles et très atteints. En effet, les tests utilisés dépendent de l'intégrité des MN qui dégèrent dans la SLA (Swash, 2012). Il y a donc très peu d'étude de la spasticité chez les patients ou dans les modèles animaux de SLA. Il est fort probable que les mécanismes pathophysiologiques de la spasticité soient différents chez les patients SLA en comparaison aux patients ayant des lésions de la moelle épinière, un AVC ou une sclérose en plaque. En effet, la SLA est un modèle unique de spasticité car la majorité des connexions cérébrospinales sont épargnées, il n'y a que le tractus corticospinal et raphé-spinal qui sont atteints. De plus, la dégénérescence progressive des MN et l'atteinte des muscles engendrent un terrain totalement différent pour l'élaboration de la spasticité.

Plusieurs pistes ont été évoquées pour tenter de percer la pathophysiologie de la spasticité dans la SLA. A l'aide d'enregistrements électrophysiologiques sur des patients SLA, une première étude a suggéré une altération de l'inhibition présynaptique (Schieppati et al., 1985). Une seconde étude a quant à elle suggérée que l'inhibition présynaptique n'était pas le seul mécanisme responsable de la spasticité mais qu'il y aurait également une baisse de l'inhibition récurrente des cellules de Renshaw (Raynor and Shefner, 1994). Ces deux études

restent purement corrélatives, encore très débattues, et rien ne nous indique clairement que ces mécanismes sont liés au développement de la spasticité. Ces changements pourraient être dus aux altérations intrinsèques liés à la dégénérescence des MN.

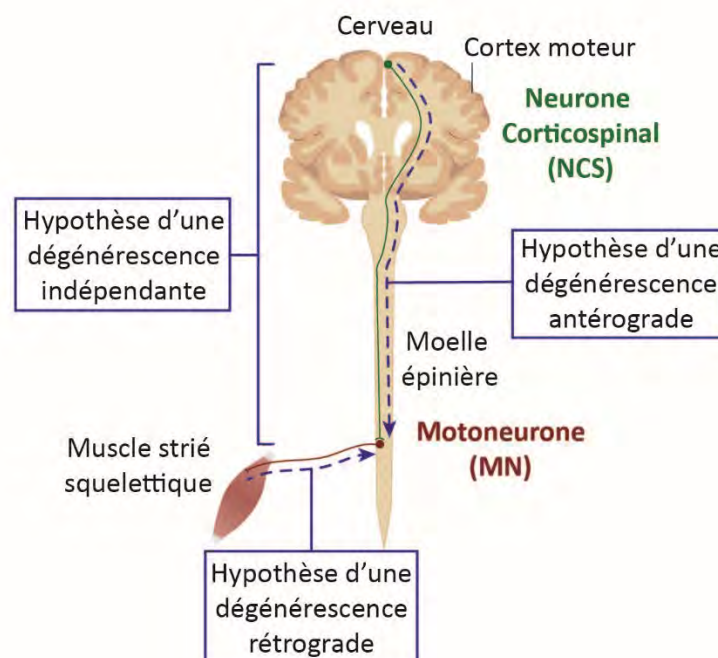
Dans les modèles animaux porteurs de la mutation *SOD1<sup>G93A</sup>*, une étude des MN de la moelle épinière a montré une diminution de l'expression membranaire du cotransporteur KCC2 (Fuchs et al., 2010). Cette diminution entrainerait une perte fonctionnelle qui pourrait participer à l'élaboration de la spasticité en changeant l'excitabilité des MN (Boulenguez et al., 2010). Cependant, dans le même modèle, une autre étude a montré qu'il n'y a pas de changement de l'expression de KCC2 mais que la spasticité était due à une diminution du nombre de cellules de Renshaw entraînant une baisse de l'inhibition récurrente (Modol et al., 2014). Néanmoins, ces études ne démontrent pas de lien de cause à effet.

Au laboratoire, il a été récemment montré que les neurones sérotoninergiques présents dans le noyau raphé des patients SLA montrent des signes de neurodégénérescence, avec une dégénérescence neuritique et parfois même une perte du corps cellulaire. De plus, les MN perdent leur innervation sérotoninergique de façon importante (Dentel et al., 2013). On retrouve ces altérations dans le modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>*, où l'on voit clairement une dégénérescence précoce des neurones sérotoninergiques du noyau raphé. Cela fait lien avec la spasticité puisqu'une perte de ce type d'innervation participe très fortement au développement de la spasticité dans les cas de lésion de la moelle épinière (Murray et al., 2010). Une seconde étude du laboratoire a montré que lorsqu'on enlève génétiquement la mutation *Sod1<sup>G86R</sup>* des neurones sérotoninergiques, on abolit la perte de ces neurones et on empêche le développement de la spasticité. Cependant, cela a un impact négatif sur les autres symptômes moteurs et on a une accélération du déclenchement de la maladie (El Oussini et al., 2017).

Le paradigme principal dans la SLA est que la spasticité provient de la dégénérescence progressive des NCS et de la perte de la connexion entre ces derniers et les MN. Cependant, ce paradigme n'a jamais été prouvé. Et les études du laboratoire montrent l'implication du système sérotoninergique dans l'élaboration de la spasticité. Ce paradigme est donc fortement remis en cause et la question de l'implication des NCS dans la spasticité reste ouverte.

## 5. Initiation et propagation de la SLA : le débat

Le site d'initiation et les mécanismes de propagation de la SLA restent une source intarissable de questionnements et d'hypothèses. Au fil des décennies, plusieurs grandes hypothèses ont été émises. Historiquement, la SLA a été décrite par Charcot comme étant une maladie neurodégénérative initiée au sein de cortex et des NCS et se propageant de manière descendante vers la moelle épinière et les MN pour finalement gagner les muscles. Dans cette vision de la SLA, la pathologie se propage selon un mode antérograde qui suit la direction des axones du système moteur (Charcot, 1869; Eisen et al., 1992). Depuis, deux autres scénarios ont été proposés : une progression rétrograde de la maladie des muscles vers le cerveau (Chou and Norris, 1993; Williamson and Cleveland, 1999), et une dégénérescence indépendante des NCS et des MN (Kiernan and Hudson, 1991; Pamphlett et al., 1995). Ces trois hypothèses sont toujours très débattues dans le domaine de la SLA (Figure 22). Pendant longtemps, l'hypothèse d'une dégénérescence rétrograde fut dominante, mais de récentes études génétiques, cliniques et histopathologiques chez l'Homme ainsi que des études précliniques dans les modèles animaux, suggèrent que le cortex cérébral serait le point d'origine de la SLA et que la pathologie se propagerait de manière antérograde (Braak et al., 2013; Eisen et al., 2017; Verde et al., 2017).



**Figure 22 : Hypothèses de l'origine et de la propagation de la SLA.** Trois hypothèses sur l'origine et la propagation de la SLA ont été émises. Pour l'instant, aucune d'entre elle n'a été complètement acceptée ou réfutée. L'hypothèse antérograde propose les neurones

corticospinaux et le cortex cérébral comme site d'initiation de la maladie, avec une propagation antérograde corticofuge. L'hypothèse rétrograde propose une initiation de la dégénérescence dans les extrémités distales des axones des motoneurones, avec une propagation rétrograde. Enfin, la troisième hypothèse propose une dégénérescence indépendante des deux populations neuronales. (Adaptation de (Taylor et al., 2016)).

### **5.1 Hypothèse d'une dégénérescence indépendante**

Charcot était le premier à croire que la maladie se propageait de manière antérograde en suivant les axones des colonnes latérales de la moelle épinière où voyagent les axones des NCS. Dès 1886, les conclusions de Charcot ont été contestées par Gowers qui pensait que les lésions observées dans le cerveau et la moelle épinière se faisaient de manière indépendante. Cependant, cette dernière hypothèse n'a pas été retenue pendant plus de cent ans (Eisen and Weber, 2001). Au début des années 1990, deux études ont tenté de revisiter cette hypothèse en s'intéressant au lien histopathologique entre les NCS et les MN (Kiernan and Hudson, 1991; Pamphlett et al., 1995). Les auteurs ont voulu savoir si un événement transneuronal secondaire à la perte des NCS pouvait être responsable de la perte des MN.

Pour tester cette hypothèse, ils ont tenté de corréliser la perte des NCS et des MN en mesurant les aires des cellules pyramidales de la couche V représentant les pieds et les mains ainsi que leurs MN correspondant au niveau spinal (Kiernan and Hudson, 1991) ou de corréliser la densité de cellules restantes dans les régions corticales et spinales représentant la main et le bras (Pamphlett et al., 1995). Ces études n'ont pas pu trouver de corrélation, ou très faible, entre les atteintes corticales des NCS et celles spinales des MN. Les auteurs alors ont conclu que ces deux populations de neurones dégénéraient de manière indépendante, à des vitesses différentes, et qu'il n'y avait pas de mécanisme de propagation transneuronal.

Les études corrélatives post-mortem sont très difficiles à interpréter chez l'homme car son système moteur est très complexe et la relation entre les NCS et les MN est multimodale. Une partie de la moelle épinière reçoit plusieurs inputs de plusieurs NCS (convergence) et un NCS peut innervier plusieurs parties de la moelle épinière, et indirectement contrôler des muscles antagonistes et agonistes (divergence) (Lemon, 2008). De plus, les réarrangements des connexions synaptiques sont fréquents et dépendent de l'expérience du sujet. Enfin, en fonction des différents muscles, le ratio de connections entre NCS et MN n'est pas le même. Tout cela rend l'interprétation de ces études très complexe (Eisen and Weber, 2001).

## 5.2 Hypothèse d'une propagation rétrograde

Plusieurs observations chez les patients SLA et dans les modèles murins *Sod1* ont conduit à l'élaboration de l'hypothèse d'une propagation rétrograde de la maladie et à la centralisation du MN dans la pathologie SLA. Dans cette hypothèse, c'est à l'extrémité distale et la jonction neuromusculaire que commence la maladie, qui progresse ensuite de manière rétrograde vers le corps cellulaire du MN puis gagne de neurone en neurone le cerveau et les NCS. L'évènement primaire se passe donc au niveau du muscle, les MN subissant une dégénérescence wallérienne (Dadon-Nachum et al., 2011).

De manière intrigante, une étude a montré par des techniques d'EMG une perte de MN chez des porteurs de mutations *SOD1* présymptomatiques (Aggarwal and Nicholson, 2002). Dans le même sens, les altérations au niveau de la jonction neuromusculaire sont déjà observables bien avant l'apparition des symptômes (Frey et al., 2000). Une étude s'est intéressée au déroulement temporel de la pathologie chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* et a montré que la dénervation arrive bien avant les symptômes, suivie de la perte des axones puis finalement de la perte des MN (Fischer et al., 2004). Ces résultats indiquent donc une neuropathie rétrograde qui commence en phase présymptomatique. D'autres études ont montré des altérations précoces dans la terminaison axonale des MN, notamment une accumulation d'inclusions cytoplasmiques, de neurofilaments (Zhang et al., 1997), la présence de mitochondries avec des formes anormales (Bendotti et al., 2001). De plus, il a été montré qu'avant l'apparition des signes cliniques, il y a déjà eu dénervation puis une réinnervation compensatoire au sein des muscles des patients SLA (Felice, 1997). Ces altérations conduisent ensuite à un défaut du transport antérograde et rétrograde (Williamson and Cleveland, 1999; Zhang et al., 1997). Un autre argument en faveur de cette hypothèse est l'accumulation de la protéine SOD1 dans les cellules de Schwann conduisant à la dénervation des jonctions neuromusculaires (Arbour et al., 2015).

Le fait que les altérations du tractus corticospinal étaient surtout visibles dans les segments spinaux ont fait penser que la SLA était due à une axonopathie avec un phénomène de « dying back ». Mais la mise en évidence de la perte de larges axones dans le tractus pyramidal au niveau pontin a montré les limites de cette hypothèse (Eisen and Weber, 2001). De plus, le problème de toutes ces études citées est qu'elles ne s'intéressent jamais aux NCS, donc rien n'indique qu'ils ne dégèrent pas avant les MN et les altérations des jonctions neuromusculaires. Une étude a montré que la vulnérabilité sélective des jonctions

neuromusculaires était due aux propriétés des axones des MN et non pas du muscle en lui-même, remettant en question l'atteinte primaire du muscle (Pun et al., 2006).

### **5.3 Hypothèse d'une propagation antérograde**

Ce sont les travaux d'Eisen (Eisen et al., 1992; Eisen and Weber, 2001) qui ont permis de remettre en avant les premières observations de Charcot. L'hypothèse d'une propagation antérograde considère le cortex cérébral comme site initiateur de la pathologie, qui est ensuite véhiculé le long des axones des neurones de projection du cortex, vers les MN du tronc cérébral et de la moelle épinière mais aussi vers d'autres structures du système nerveux central (Eisen and Weber, 2001).

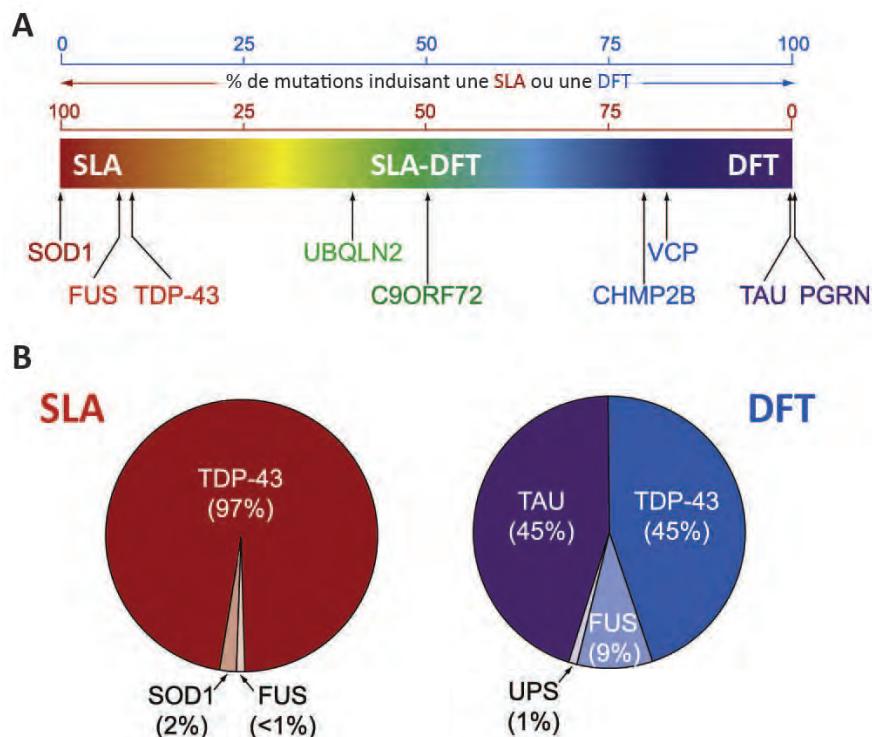
## **6. Arguments en faveur d'une origine corticale et d'une propagation corticofuge**

### **6.1 Arguments génétiques**

Les récentes avancées de la génétique et la découverte de nouvelles mutations associées à la SLA comme *TDP-43*, *FUS* ou *C9ORF72* ont permis de mieux comprendre la physiopathologie et de lier la SLA avec une autre maladie, la démence frontotemporale (DFT). En effet, il existe un continuum génétique entre ces deux maladies neurodégénératives qui partagent plusieurs mutations communes, (Ling et al., 2013) (Figure 23). Ainsi, la SLA est associée avec une pathologie purement corticale, la DFT où les lobes frontaux et temporaux sont affectés. Les patients présentent une atrophie corticale et une perte neuronale, qui se traduit par de nombreux troubles cognitifs, mais pas d'atteinte des NCS et des MN et donc pas de trouble moteur. Cependant, il est établi que 15% des patients SLA développent une DFT et inversement. Le lien entre ces deux maladies n'est pas seulement génétique, il est aussi pathologique. En effet, plus de 97% des patients SLA, qu'ils soient de formes familiales ou sporadiques et jusqu'à 45% des patients DFT présentent des inclusions cytoplasmiques toxiques de la protéine TDP-43 phosphorylée (Ling et al., 2013; Neumann et al., 2006; Van Langenhove et al., 2012). Ces deux pathologies, à première vue très différentes d'un point de vue symptomatologique, partagent des altérations génétiques, pathologiques et cliniques sous la forme d'un continuum dont elles représenteraient chacune une extrémité (Figure 23). De manière intéressante, elles partagent toutes deux une altération du cortex cérébral



soulignant un rôle potentiel de cette région dans l'initiation et le développement de ces deux pathologies (Burrell et al., 2011; Lillo and Hodges, 2009; Lomen-Hoerth et al., 2002).

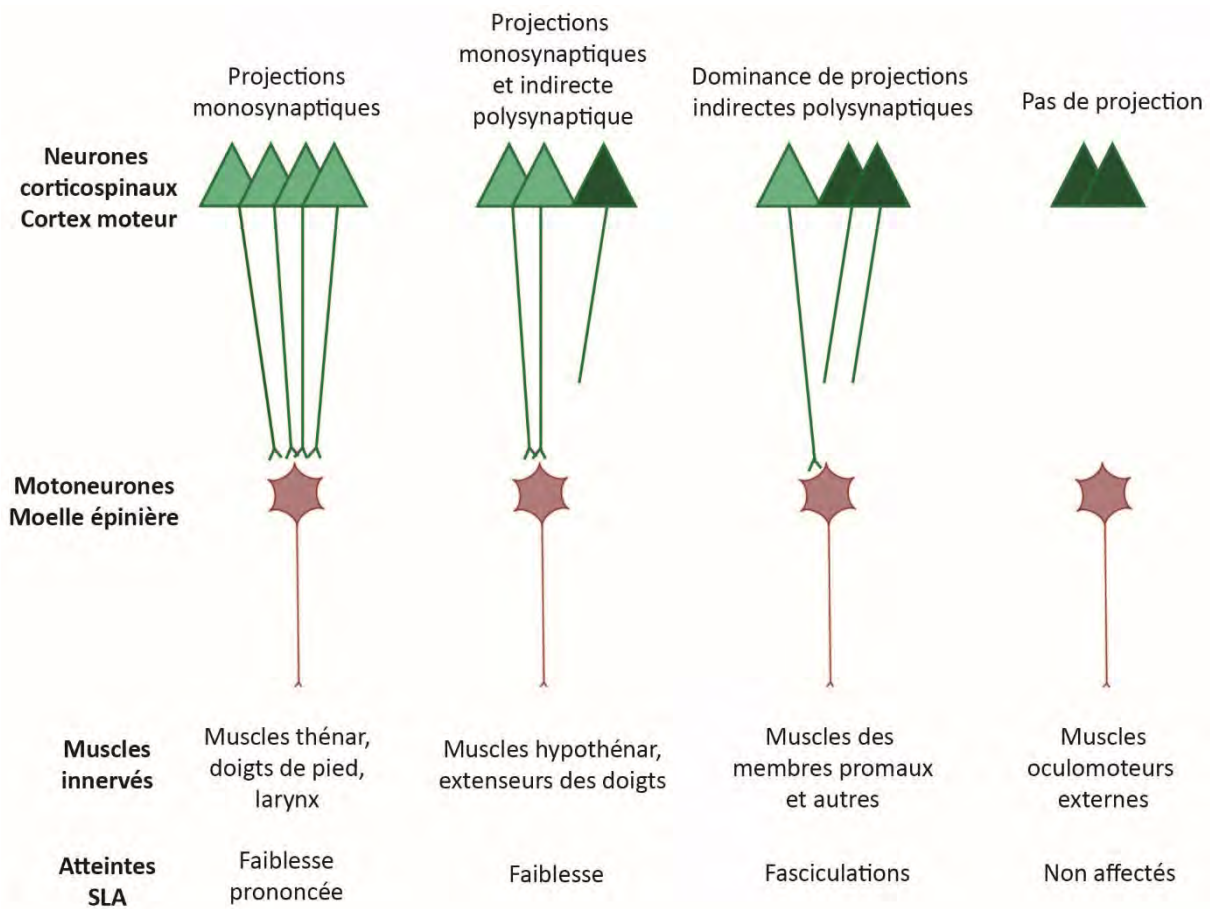


**Figure 23 : Le continuum entre la SLA et la démence fronto-temporale.** Il existe un continuum clinique, génétique et pathologique entre la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT). Ces deux maladies représenteraient les extrêmes de ce continuum neurodégénératif. **A)** La SLA et la DFT partagent plusieurs mutations communes. Les principaux gènes retrouvés dans les cas familiaux sont représentés en fonction du ratio donnant lieu à l'une ou l'autre maladie. **B)** Des inclusions pathologiques sont présentes dans le cerveau des patients SLA et DFT. Ces deux maladies partagent des inclusions TDP-43 et FUS. (Adaptation de (Ling et al., 2013)).

## 6.2 Arguments cliniques

La « main de singe » (split hand, en anglais) est un signe clinique où le pouce s'aligne sur les autres doigts qui ont chacun leurs deux dernières phalanges rétractées. Cela est due à l'atrophie plus marquée des muscles de l'éminence thénar et de la première loge dorsale interosseuse en comparaison aux muscles de l'éminence hypothénar (Menon et al., 2014). Ce signe, typique des patients ayant une atteinte primaire des membres supérieurs, suggère

également une origine corticale de la maladie. En effet, cette différence d'atrophie des muscles thénars et hypothénars peut s'expliquer par une représentation corticale différente. Les muscles thénars qui ont une atrophie plus importante sont également plus représentés au niveau cortical, à cause de leur rôle important dans la fonction de préhension des doigts (Menon et al., 2014; Weber et al., 2000). Ainsi, à cause de leur plus grande et plus forte connexion avec les NCS due à leur activité et leur fonction, les muscles thénars seraient plus sensibles à la pathologie que les muscles hypothénars.



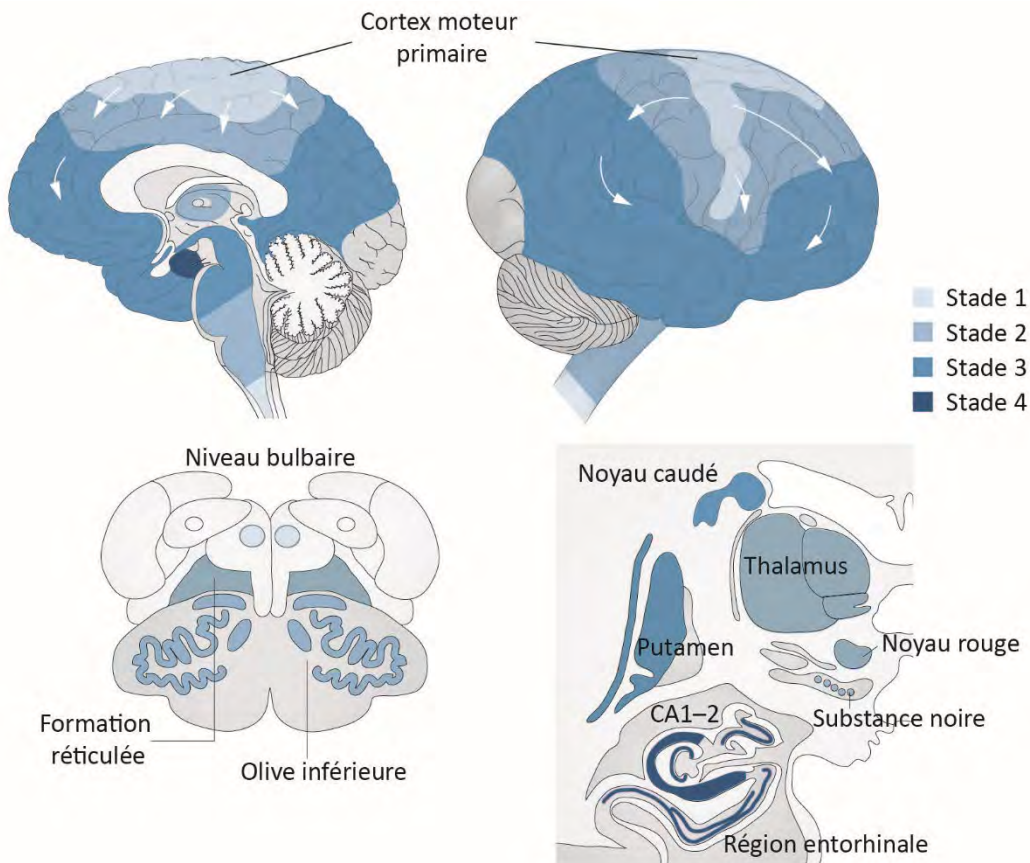
**Figure 24 : Influences du type de connexion synaptique entre les neurones corticospinaux et les motoneurons sur les symptômes SLA.** Chez l'Homme, les motoneurons (MN) peuvent recevoir de la part des neurones corticospinaux (NCS) des projections directes monosynaptiques ou indirectes polysynaptiques. Les muscles connectés par des MN recevant de nombreuses connexions monosynaptiques sont plus affectés que ceux qui n'en reçoivent que très peu. Les muscles dont les MN ne reçoivent pas de projections des NCS ne sont pas affectés dans la SLA. (Adaptation de (Eisen et al., 2017)).

De manière plus générale, il existe une forte corrélation entre la manière dont les NCS connectent les MN et le degré d'altération du muscle innervé (Eisen et al., 2017) (Figure 24). Chez l'Homme, les NCS peuvent faire directement synapse sur les MN, on parle de connexion monosynaptique. De plus, un MN peut recevoir des connexions de plusieurs NCS, c'est le principe de convergence (Lemon, 2008). Chez les patients SLA, les muscles les plus atteints sont ceux dont les MN reçoivent de nombreuses connexions monosynaptiques de la part des NCS, comme les muscles des extrémités : main, larynx, orteils. Les muscles recevant des connexions indirectes, polysynaptiques, sont moins affectés, notamment les muscles proximaux des membres (de Noordhout et al., 1999; Eisen et al., 2017). Il est intéressant de noter que dans les cas où la pathologie se déclare en premier lieu dans les membres supérieurs, il est plus fréquent que le premier membre affecté soit le membre dominant (Turner et al., 2013). De manière remarquable, dans la SLA, il existe deux types de MN qui résistent plus longtemps à la neurodégénérescence, ce sont les MN qui innervent les muscles oculomoteurs externes, régulant les mouvements oculaires, et les MN contrôlant les muscles des sphincters (Brettschneider et al., 2013a; Büttner and Büttner-Ennever, 2006; Carvalho et al., 1995; Okamoto et al., 1993). Ces MN largement épargnés, sont dépourvus de connexions monosynaptiques avec les NCS (Figure 24). Néanmoins, chez les patients ayant des durées de maladie très longues, on observe une légère dégénérescence de ces MN pouvant s'accompagner d'une atrophie musculaire et d'atteintes fonctionnelles.

Chez 98% des patients SLA, les premiers symptômes moteurs commencent dans une seule région du corps. Les atteintes des NCS et des MN y sont alors maximales puis les altérations progressent de régions en régions (Ravits et al., 2007a; Ravits et al., 2007b; Ravits and La Spada, 2009). Lorsque la maladie débute dans un membre, c'est toujours l'hémisphère contralatéral qui est le plus affecté alors que l'hémisphère ipsilatéral est épargné, au début de la maladie, qui gagne ensuite l'ensemble du cerveau lorsque l'ensemble du corps est affecté (Zhang et al., 2014a). Ces différents résultats cliniques montrent qu'il existe une relation somatotopique entre les NCS et les MN dans la pathologie de la SLA. Les symptômes musculaires observés reflètent d'une part les représentations corticale et fonctionnelle des différents muscles et d'autres par la manière dont les NCS connectent les MN. Ces observations suggèrent que le cortex est la source pathologique de la SLA, avec une propagation antérograde lié au type de connexion synaptique (Braak et al., 2013; Eisen et al., 2017).

### 6.3 Arguments pathophysiologiques

La pathologie TDP-43 se retrouve chez pratiquement tous les patients SLA, et affecte aussi bien le cerveau que la moelle épinière. Les examens post-mortem des inclusions cytoplasmiques toxiques de TDP-43 chez des patients SLA ont montré que la région du cerveau la plus affectée est le cortex moteur, en plus du tronc cérébral et de la moelle épinière (Ling et al., 2013; Neumann et al., 2006). L'étude approfondie de la « pathologie TDP-43 » a permis de définir plusieurs stades pathologiques, selon la fréquence à laquelle les agrégats étaient retrouvés dans les différentes régions du cerveau (Brettschneider et al., 2013a). Les auteurs ont alors proposé une possible progression temporelle de la pathologie TDP-43, le long des faisceaux corticofuges, plus connue sous le terme « d'hypothèse corticofuge » (Braak et al., 2013) (Figure 25).



**Figure 25 : Hypothèse d'une propagation séquentielle corticofuge de la pathologie TDP-43.** Selon l'hypothèse développée par Brettschneider et collaborateurs en 2013, la propagation de la pathologie TDP-43 se ferait en 4 stades, atteignant successivement les différentes régions du système nerveux central. (Adaptation de (Braak et al., 2013)).

Stade 1 : Les premiers agrégats apparaissent dans les grandes cellules pyramidales de la couche V du cortex moteur et les neurones de projections incluant les cellules de Betz et les NCS. Les MN des noyaux moteurs du tronc cérébral et ceux présent dans la moelle épinière sont également affectés dès ce stade.

Stade 2 : La pathologie gagne le cortex prémoteur et les aires préfrontales adjacentes ainsi que la partie parvocellulaire du noyau rouge, l'olive inférieure et la formation réticulée dans le tronc cérébral.

Stade 3 : La pathologie continue de se développer dans le cortex préfrontal et touche les aires sensorielles post-centrales ainsi que les neurones de projection de taille moyenne du striatum.

Stade 4 : Le stade final marque l'altération des lobes temporaux et du cortex entorhinal incluant la formation hippocampique.

L'hypothèse corticofuge, selon laquelle la maladie prendrait naissance au sein du cortex moteur et se propagerait vers ses cibles a été en partie confirmée par une étude longitudinale en tenseur de diffusion sur des patients vivants (Kassubek et al., 2014). Cette étude a évalué l'état des différents tractus corticofuges. Les premières anomalies apparaissent dans le tractus cortico-spinal (stade 1). Les tractus cortico-rubral et cortico-pontique sont ensuite touchés (stade 2), puis le cortico-striatal (stade 3) et finalement la portion proximale de la voie perforante de la formation hippocampique (stade 4) (Kassubek et al., 2014).

Enfin, l'analyse récente par IRM du connectome de cerveaux de patients SLA, suggère encore une progression séquentielle de la maladie selon la topologie des réseaux cérébraux (Verstraete et al., 2014b). Les régions impliquées dans les différents stades de la pathologie TDP-43 sont étroitement connectées entre elles. Les patients étant aux premiers stades de la maladie montrent une plus grande connectivité que les patients se trouvant dans des stades avancés de la SLA. L'imagerie par tenseur de diffusion a mis en évidence une corrélation positive entre la perte de connectivité et la baisse de la fraction anisotropique dans le tractus corticospinal (Verde et al., 2017).

#### **6.4 Arguments électrophysiologiques**

Les études électrophysiologiques des patients SLA vont également dans le sens d'une origine corticale de la maladie. En effet, on retrouve des altérations corticales et notamment

une forte hyperexcitabilité aussi bien chez les patients ayant des formes familiales que les patients avec des formes sporadiques (Eisen et al., 1992; Vucic et al., 2008). Plusieurs études suggèrent que l'hyperexcitabilité est une composante précoce de la SLA (Eisen and Weber, 2000; Vucic et al., 2006; Vucic and Kiernan, 2008). Un suivi longitudinal de porteurs de mutation *SOD1* montre que l'hyperexcitabilité corticale se développe avant les premiers signes cliniques (Vucic et al., 2008). De ces travaux a été émis l'hypothèse que l'hyperexcitabilité corticale entraînerait un changement de l'activité électrique des NCS. Ils deviendraient hyperexcitables et relargueraient de grandes quantités de glutamate sur leurs cibles du tronc cérébral et de la moelle épinière, notamment les MN, à l'origine d'une excitotoxicité glutamatergique, suspectée comme impliquée dans la mort des MN (Geevasinga et al., 2016a; Geevasinga et al., 2016c). Cela fait sens car aujourd'hui le seul médicament disponible et relativement efficace est le Riluzole, un anti-glutamatergique (Bensimon et al., 1994).

## 6.5 Arguments précliniques

Ces différents arguments issus des analyses de patients et de tissus post-mortem ont également été confirmés dans des études précliniques sur les modèles animaux. Même si les études sur le cortex et les NCS ne sont pas nombreuses, certaines vont dans le sens de l'hypothèse corticofuge et d'une origine corticale de la SLA et confirment donc les recherches cliniques. Ces études vont même plus loin et apportent de nouveaux arguments.

Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, de nombreuses altérations morphologiques et fonctionnelles ont été retrouvées avant l'établissement des symptômes moteurs. C'est le cas de la dégénérescence des dendrites apicales et des épines dendritiques ainsi que l'hyperexcitabilité neuronale (Fogarty et al., 2015; Jara et al., 2012; Ozdinler et al., 2011; Saba et al., 2016). Une des premières études précliniques à vouloir comprendre le rôle potentiel du cortex dans la SLA est celle de Thomsen en 2014, sur des rats portant la mutation *SOD1<sup>G93A</sup>*. Les auteurs ont tenté d'éliminer l'expression du transgène pathogénique *SOD1<sup>G93A</sup>* dans le cortex moteur des rats, à l'aide d'un ARN en épingle de cheveux (shRNA) (Thomsen et al., 2014). La diminution sélective de l'expression du mutant de la *SOD1* dans le cortex moteur est suffisante pour retarder l'apparition de la maladie, prolonger significativement la survie des animaux tout en protégeant les MN et les jonctions neuromusculaires. Malgré le fait que l'expression de la *SOD1* mutante n'était pas tout à fait abolie dans le cortex ou n'était pas restreinte à une seule

population d'intérêt comme les NCS, cette étude a le mérite de montrer que le cortex cérébral joue un rôle important dans le déclenchement et la progression de la pathologie.

Le débat sur l'origine et la propagation de la SLA n'est pas encore tranché et les trois hypothèses présentées restent toutes valables. Malgré de nombreuses études qui vont dans le sens de l'hypothèse corticofuge chez les patients SLA, aucune étude n'a pu la confirmer dans les modèles animaux. Il est donc primordial de définir précisément la contribution du cortex et des NCS dans les modèles de SLA.

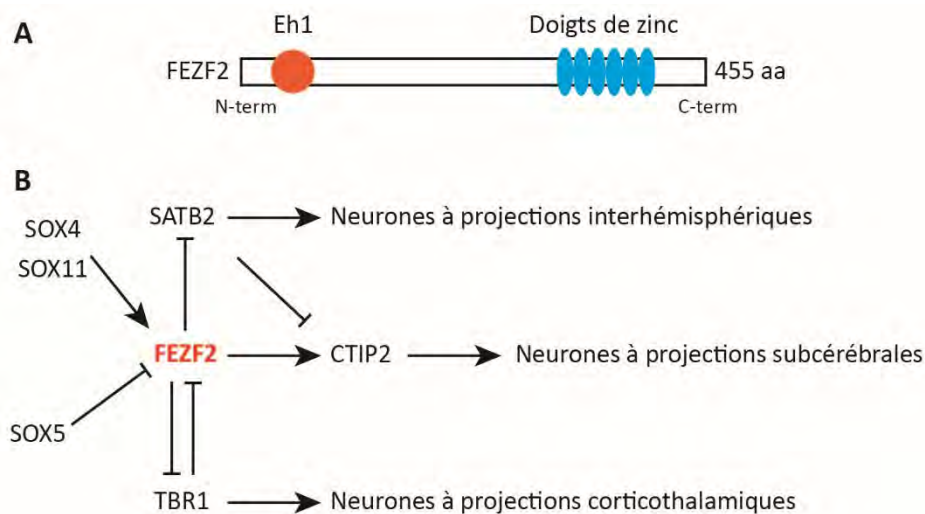
## **7. Comment tester la contribution du cortex chez la souris ?**

Pour pouvoir étudier la contribution du cortex cérébral et des NCS dans la SLA, il est important de comprendre leur fonctionnement normal et de développer des outils permettant de les étudier. Depuis le début des années 2000, de nombreuses études ont permis une meilleure compréhension de la physiologie des NCS et de leur place au sein du cortex cérébral (Eckler and Chen, 2014; Molyneaux et al., 2007). Les mécanismes permettant la genèse de ces neurones sont maintenant mieux connus, notamment grâce au développement d'outils dont l'utilisation peut être étendue au domaine de la neurodégénérescence.

### **7.1 Le facteur de transcription Fezf2**

*Fezf2* est un gène très conservé au cours de l'évolution, appartenant à la famille des facteurs de transcription Fez pour Forbrain embryonic zinc finger. Il a été originellement identifié chez le poisson zèbre comme étant un gène dont l'expression augmente lors de la surexpression de *Dkk1*, un inhibiteur de *Wnt*, induisant alors le développement du tissu neuronal antérieur (Hashimoto et al., 2000). En tant que facteur de transcription, FEZF2 contient un motif répresseur Eh1 (Engrailed homology 1) dans la partie amino-terminale et six motifs C2H2 en doigt de zinc qui lient l'ADN dans la partie carboxy-terminale (Eckler et al., 2014; Hashimoto et al., 2000; Shimizu and Hibi, 2009) (Figure 26). Des recherches bio-informatiques ont ensuite permis d'identifier des gènes orthologues chez différentes espèces comme la souris et l'Homme (Eckler et al., 2014).

Chez la souris, l'expression de *Fezf2* est détectable à partir du 8<sup>ème</sup> jour de la vie embryonnaire (E8.5) dans le prosencéphale et le système olfactif (Hirata et al., 2006a; Hirata et al., 2006b; Hirata et al., 2004). Au douzième jour de la vie embryonnaire (E12.5), l'expression de *Fezf2* se restreint. Au niveau du système olfactif, on le retrouve confiné à l'organe voméronasal et au niveau du prosencéphale, on le retrouve dans les progéniteurs neuronaux du télencéphale dorsal, de l'éminence thalamique, du préthalamus et de l'hypothalamus. Au quinzième jour de la vie embryonnaire (E15.5), l'expression de *Fezf2* est majoritaire dans le cortex cérébral où il est fortement exprimé par les neurones postmitotiques des couches profondes et faiblement dans les progéniteurs neuronaux. Plus précisément, *Fezf2* est limité aux neurones à projection corticofuge de la couche V (majoritaire) et aux neurones projetant vers le thalamus de la couche VI (minoritaire). L'expression de *Fezf2* dans le cortex continue jusqu'à l'âge adulte (Arlotta et al., 2005; Chen et al., 2005; Hirata et al., 2004; Molyneaux et al., 2005).



**Figure 26 : Le facteur de transcription Fezf2 permet la genèse des neurones à projections subcérébrales.** **A)** *Fezf2* est un facteur de transcription comprenant notamment un motif répresseur Eh1 dans sa partie N-terminale et 6 motifs à doigts de zinc dans sa partie C-terminale. **B)** *Fezf2* est au cœur des voies qui régulent la genèse des différents neurones de projections du cortex. Il coordonne la régulation de l'expression de différents gènes et permet *in fine* la génération de neurones à projections subcérébrales.



Durant le développement du cortex cérébral, *Fezf2* dirige la spécification des progéniteurs neuronaux en neurones glutamatergiques à projection subcérébrale, comprenant notamment les NCS (Chen et al., 2005; Molyneaux et al., 2005) (Figure 26). En régulant l'activité de plusieurs gènes impliqués dans la neurogenèse, la spécification neuronale et la guidance axonale, *Fezf2* contrôle le développement des neurones à projection subcérébrale en assurant leur spécification et leur maturation. Le maintien de son expression à l'âge adulte suggère que *Fezf2*, pourrait également assurer le maintien de l'identité des neurones à projection subcérébrale (Eckler and Chen, 2014; Hirata et al., 2004). La surexpression de *Fezf2*, dans des progéniteurs corticaux sensés donner naissance aux neurones des couches superficielles suffit à inférer une identité de neurone excitateurs corticofuge des couches profondes du cortex (Molyneaux et al., 2005). *Fezf2* est en effet capable à la fois de réprimer le programme génétique initial et d'activer les gènes spécifiques des neurones des couches profondes du cortex (Lodato et al., 2014). Par exemple, FEZF2 se fixe au promoteur de *Stab2* (identité des neurones à projections calleuses des couches superficielles) pour réprimer son expression et en parallèle induire l'expression de CTIP2 (identité des neurones à projections corticofuges des couches profondes) (Chen et al., 2008; Lodato et al., 2014; Lodato et al., 2011)(Figure 26). Des études de transcriptomique plus récentes ont permis de mieux comprendre comment FEZF2 interagit avec ses différentes cibles et mettent en lumière son rôle clef dans le développement et la spécification des NCS (Clare et al., 2018; Clare et al., 2017).

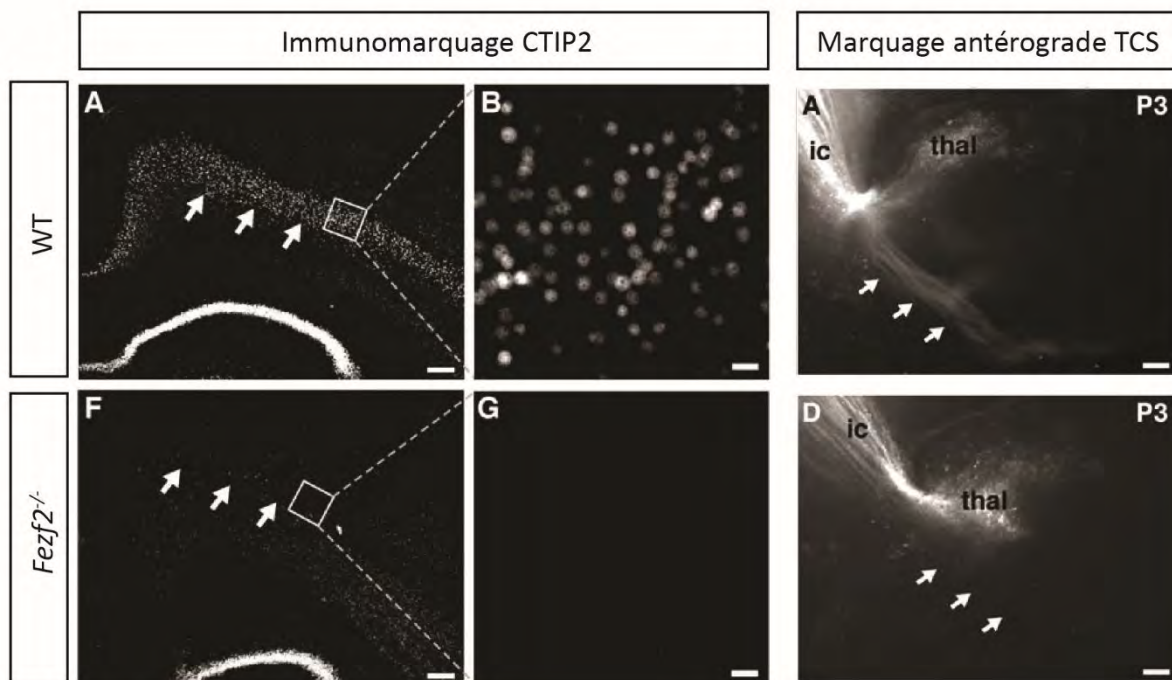
En dehors du système nerveux, FEZF2 est fortement exprimé dans la peau et l'estomac, sans que l'on sache quel est son rôle (Hirata et al., 2004). FEZF2 est également exprimé dans le thymus, à des taux comparables à ceux du système nerveux central (Hirata et al., 2004). Dans cet organe, FEZF2 semble jouer un rôle important dans le processus de présentation des antigènes et dans l'auto-immunité (Takaba et al., 2015).

## 7.2 Les souris *Fezf2* KO

La génération de souris knock-out pour *Fezf2* a permis de mieux comprendre le rôle de ce gène dans la génération des neurones à projection subcérébrale de la couche V du cortex (Chen et al., 2005; Hirata et al., 2004; Molyneaux et al., 2005). En effet, la suppression de *Fezf2* conduit à l'absence de neurones à projection subcérébral, et notamment de NCS, entraînant

ainsi l'absence de connexion entre le cortex cérébral et la moelle épinière (Molyneaux et al., 2005) (Figure 27).

D'un point de vue phénotypique, l'absence de NCS n'a pas d'effet moteur grave visible chez les souris, qui sont capables de se mouvoir correctement, de se développer et de se reproduire (Molyneaux et al., 2005). Cependant, ces animaux sont hyperactifs en open field (Hirata et al., 2004), et présentent des altérations de l'équilibre excitation/inhibition cortical pouvant entraîner des crises d'épilepsie en réponse à une stimulation sonore importante (Lodato et al., 2011). A notre connaissance, les capacités motrices fines n'ont pas été testées chez les souris KO pour *Fezf2*, et on ne peut exclure la possibilité de conséquences motrices en réponse à l'absence de NCS chez ces souris.



**Figure 27 : Les souris *Fezf2* KO n'ont pas de neurones corticospinaux ni de connexion à la moelle épinière.** Les souris *Fezf2* Knock-out (KO) présentent une absence totale de neurones corticospinaux, révélé par l'absence de marquage CTIP2 contrairement aux contrôles WT où il est exprimé dans la couche V du cortex moteur, comprenant les neurones corticospinaux. L'injection d'un marqueur antérograde montre l'absence du tractus corticospinal et de connexion vers la moelle épinière chez les souris dépourvues de *Fezf2*. Abréviations : thal : thalamus ; ic : capsule interne. (Résultats tirés de (Molyneaux et al., 2005)).

L'observation macroscopique et microscopique du cortex cérébral permet de constater de nombreux changements dus à l'absence de *Fezf2*. Tout d'abord, l'épaisseur globale du cortex reste identique chez ces souris. Cependant, l'épaisseur de la couche V est réduite et cette réduction est compensée par l'augmentation de celle de la couche VI. Cela intervient sans mort cellulaire ni changement du taux de neurogenèse ou encore de migration neuronale (Molyneaux et al., 2005). La diminution de l'épaisseur de la couche V s'explique par la disparition des larges neurones pyramidaux à projection subcérébrale. A défaut de neurones à projection subcérébrale, les progéniteurs des neurones de la couche V donnent naissance à des neurones à projection interhémisphérique dont les axones empruntent la commissure antérieure (Lodato et al., 2014). Ces résultats indiquent que *Fezf2* régule le destin cellulaire des progéniteurs neuronaux et induit la spécification de neurones à projection subcérébrale. Les souris *Fezf2* KO présentent également une distribution anormale des interneurones corticaux. Il y a une diminution de leur nombre dans la couche V et une augmentation dans les couches II/III et IV. La couche VI n'est pas affectée. Ces changements induisent une perturbation de la balance excitation/inhibition corticale où le réseau de neurones inhibiteurs est altéré (Lodato et al., 2011). L'absence de *Fezf2* n'affecte pas l'identité des interneurones, en revanche la lamination des différents interneurones est altérée (Lodato et al., 2011). Cela indique que les NCS interviennent dans le recrutement des interneurones et l'élaboration des réseaux neuronaux corticaux.

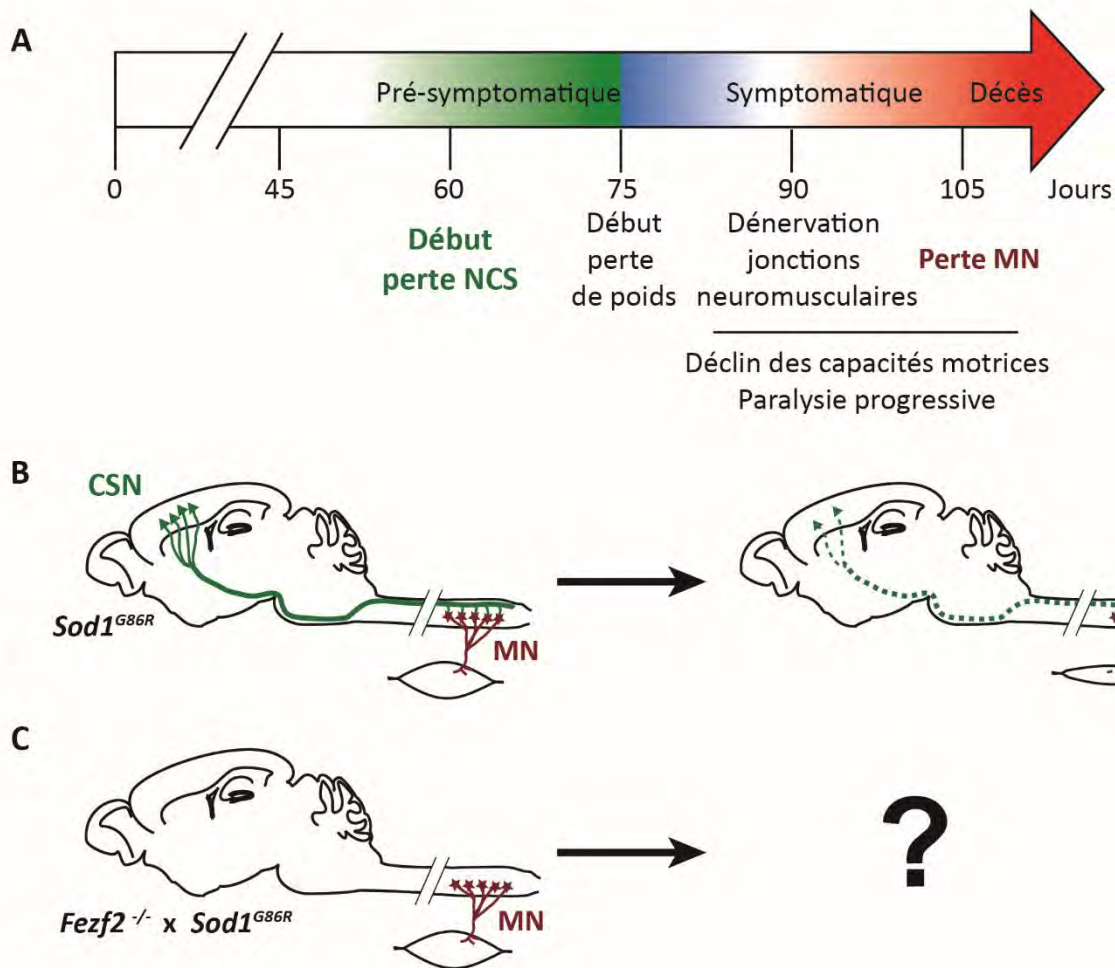
En plus d'être importantes pour la compréhension de la physiologie du gène, les souris *Fezf2* KO s'avèrent être un outil prometteur pour étudier l'absence de NCS et de connexion à la moelle épinière dans le contexte de la SLA.

# **Problématique et objectifs de thèse**

Durant l'introduction, nous avons présenté la SLA, une maladie neurodégénérative du système moteur adulte, rare et incurable, dont l'étiologie est encore mal comprise. La SLA fait preuve d'une étonnante diversité sur le plan clinique et génétique. Les signes cliniques peuvent varier d'un patient à l'autre en termes d'âge de déclenchement, de site d'apparition, de progression et de présentation. Ils sont le reflet de l'atteinte des NCS et des MN mais peuvent aussi résulter du dysfonctionnement d'autres systèmes, notamment métabolique. Une grande majorité de patients sont qualifiés de cas sporadiques (90%) et une petite proportion sont qualifiés de cas familiaux (10%) où l'on retrouve une mutation transmise à la descendance. Plus de 30 mutations ont été associées à la SLA. Cette forte hétérogénéité rend le diagnostic, l'évaluation de la progression et le développement de traitement délicat.

Dans la recherche sur la SLA, deux grandes questions n'ont pas encore été élucidées : **1) quelle est l'origine de la pathologie ? 2) comment se propage-t-elle ?** Des études récentes génétiques, cliniques et histopathologiques menées chez les patients SLA tendent à montrer que le cortex et les NCS seraient le point initiateur de la maladie et qu'il y aurait une propagation corticofuge de la pathologie, se faisant au travers des axones des neurones de projection. Cette hypothèse formulée à partir de données de patients n'a jamais été testée dans les modèles de SLA.

D'intenses efforts de recherches ont permis le développement de modèles à partir des mutations observées dans les cas familiaux de SLA. Les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* ont montré leur pertinence pour étudier le cortex et les NCS. **L'objectif de ma thèse est de tester pour la première fois dans un modèle murin, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, le rôle du cortex et des NCS dans le déclenchement et la progression de la SLA.** Pour ce faire, j'ai croisé les souris *Fezf2<sup>-/-</sup>* aux souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, afin de générer un modèle murin sensé développer une SLA (en réponse à l'expression ubiquitaire du transgène *Sod1<sup>G86R</sup>*), mais dépourvu de NCS (en absence du facteur de transcription Fezf2). Un tel modèle va donc à l'encontre de la définition clinique de la SLA, qui s'appuie sur la dégénérescence conjointe des NCS et MN. Mais il permet de poser la problématique de la thèse : **quel est l'impact de l'absence de NCS sur le déclenchement et la progression de la SLA ?** L'étude des capacités motrices, des altérations électrophysiologiques et histologiques des souris *Fezf2<sup>-/-</sup>-Sod1<sup>G86R</sup>* a permis au cours de cette thèse de répondre à la problématique.



**Figure 28 : Problématique et objectifs de thèse. A-B)** Les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* développent une paralysie progressive les conduisant au décès vers 105 jours. La perte des neurones corticospinaux (NCS) précède celle des motoneurones (MN) et commence précocement, dès 60 jours. La perte de poids annonce le début de la maladie à 75 jours et les premiers symptômes moteurs apparaissent vers 90 jours, à la dénévation des jonctions neuromusculaires. **C)** Quel est l'impact de l'absence de NCS sur le déclenchement et la progression de la pathologie chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* ? Quel sera l'impact sur la perte de poids, la dénévation et la perte des MN et finalement le développement des symptômes moteurs ?

# RESULTATS

**Absence of subcerebral projection neurons delays disease onset and extends survival  
in a mouse model of ALS**

Thibaut Burg<sup>1</sup>, Charlotte Bichara<sup>2</sup>, Jelena Scekcic-Zahirovic<sup>1</sup>, Mathieu Fischer<sup>1,3</sup>, Geoffrey Stuart-Lopez<sup>1</sup>, François Lefebvre<sup>4</sup>, Matilde Cordero-Erausquin<sup>2</sup> & Caroline Rouaux<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm UMR\_S 1118, Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>2</sup> UPR 3212, Institut des neurosciences cellulaires et intégratives, UPR 3212 CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>3</sup> Current address: Department of Pediatrics, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, Oxford, UK.

<sup>4</sup> Laboratoire de biostatistique, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

\*Correspondence should be addressed to: C.R. ([caroline.rouaux@inserm.fr](mailto:caroline.rouaux@inserm.fr))



## Abstract

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease of adulthood that affects voluntary motricity and rapidly leads to full paralysis and death. Clinical and histopathological definitions of ALS rely on the combined degeneration of corticospinal neurons and corticobulbar neurons in the cerebral cortex (CSN), and motoneurons in the spinal cord and brain stem (SMN). Recent genetic, functional, and histopathological studies carried on ALS patients suggest that the disease may originate in the cerebral cortex and spread to its projection targets according to the so called “corticofugal hypothesis”. To test this hypothesis, we specifically assessed the contribution of the major corticofugal projection neuron population, the subcerebral projection neurons (SubCerPN), that have the farthest and widest targets of all cortical projection neurons, and that include the disease-relevant CSN subpopulation. To this aim, we crossbred the *Sod1<sup>G86R</sup>* mouse model of ALS to the *Fezf2<sup>-/-</sup>* mouse line that lacks CSN and other SubCerPN. Our data indicate that absence of SubCerPN delays disease onset and increases survival without modifying disease duration. In addition, during the course of the disease, weight loss was greatly reduced and motor symptoms delayed and mitigated. Yet, absence of SubCerPN and CSN does not prevent nor modulate emergence of spasticity, which rather correlates with loss of serotonergic neurons. Together, the data are in favor of a major contribution of the cerebral cortex and its outputs to ALS onset and progression.

## Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease characterized by rapidly progressing muscle atrophy and paralysis, leading to death within only two to five years of diagnosis. Clinically and histologically, ALS is defined as the combined and progressive loss of two broad neuronal populations involved in motor control: the corticospinal and corticobulbar neurons (CSN, or upper motor neurons), in the motor cortex, and the spinal and bulbar motoneurons (SMN, or lower motor neurons) in the brain stem and spinal cord (Brown and Al-Chalabi, 2017; van Es et al., 2017). This duality of targeted neuronal populations and affected regions of the central nervous system has fostered a long-time debate regarding the origin of the disease along the cortical-spinal cord-muscular axis (reviewed in (Ravits and La Spada, 2009)).

The French Neurologist Jean-Martin Charcot who provided the first description of ALS suggested a cortical origin of the disease and a descending propagation from the motor cortex to the spinal cord (Charcot, 1869). Following Charcot's histological description of the disease, comprehensive clinical examination of ALS patients unravelled series of signs highly suggestive of a cortical origin of the disease, such as the split hand syndrome and typical gait abnormalities, amongst others (Eisen et al., 1992). Meanwhile, trans-magnetic stimulation studies unravelled early hyperexcitability of the motor cortex that characterizes both sporadic and familial ALS patients, negatively correlates with survival, and manifests prior to disease onset, pointing to a potential role of the motor cortex in disease initiation (Vucic and Kiernan, 2017). It is proposed that cortical hyperexcitability may translate into glutamatergic excitotoxicity to the downstream targets of the corticospinal neurons, the alpha motoneurons of the brain stem and spinal cord, providing a first possible mechanism for corticospinal propagation (Eisen et al., 2017). Finally, the recent proposed staging of the histopathological

burden that characterizes the vast majority of ALS patients, the TDP-43 pathology (Brettschneider et al., 2013a), led to the emergence of the so-called corticofugal hypothesis. According to it, the disease may originate in the motor cortex and misfolded TDP-43 proteins may disseminate with a prion-like mechanism to the direct, mono-synaptic targets of cortical projection neurons along the main corticofugal routes (Braak et al., 2013).

If corticofugal propagation is supported by longitudinal diffusion tensor imaging studies with tractography or connectome analysis of ALS patients (Kassubek et al., 2014; Verstraete et al., 2014b), it cannot be directly tested in patients. In spite of the heavy differences that exist between species, and in particular the uniqueness of the Human and primate corticomotoneuronal system (Eisen et al., 2017), we reasoned that mouse genetics could prove useful to directly address a potential cortical origin and corticofugal propagation of disease.

In rodents, like in Human, corticofugal projections correspond to two broad neuronal populations of excitatory projection neurons, i.e., the subcerebral projection neurons (SubCerPN) and the (Lodato et al., 2015). CThN are located in the cortical layer VI and connect the cerebral cortex to the various thalamic nuclei, that connect back to the cerebral cortex, creating a loop of reciprocal sensory processing (Briggs and Usrey, 2009). SubCerPN are located in the cortical layer V and connect the various regions and areas of the cerebral cortex to its most distance targets. While the thalamus is affected by the TDP-43 pathology as early as stage 2 (Brettschneider et al., 2013a), and shows impairment in imaging studies (Chiò et al., 2014), a major contribution of CThN to ALS is not suspected. SubCerPN instead include, amongst other subpopulations, the disease-relevant corticospinal neurons (CSN) that connect the cerebral cortex to the spinal cord. While major differences exist between primates and rodents regarding the route of the corticospinal tract within the spinal cord, and the

connectivity mode of the CSN onto the alpha motoneurons, i.e. both mono- and pluri-synaptic in primates, and essentially pluri-synaptic in adult mice (Lemon, 2008), it is worth highlighting that many mouse models of the disease recapitulate CSN or SubCerPN degeneration (Fil et al., 2017; Handley et al., 2017; Liu et al., 2016; Marques et al., 2019a; Ozdinler et al., 2011; Yasvoina et al., 2013; Zang and Cheema, 2002). In this regard, we recently showed that *Sod1<sup>G86R</sup>* mice not only display pre-symptomatic CSN degeneration, but also that CSN and spinal motoneuron degeneration are somatotopically related (Marques et al., 2019a), as this has been described in ALS patients (Mochizuki et al., 2011; Ravits et al., 2007a; Zhang et al., 2014a).

Here, we sought to test the contribution of CSN and other SubCerPN to disease onset and progression by taking advantage of the *Fezf2* knock-out mice (Hirata et al., 2004) that develop in absence of SubCerPN (Molyneaux et al., 2005). These animals lack the gene encoding a master transcription factor that is both necessary (Hirata et al., 2004; Molyneaux et al., 2005).

## Results

### Generation of the *Fezf2*<sup>-/-</sup>; *Sod1*<sup>G86R</sup> mice

To test the contribution of the motor cortex and more broadly of the cerebral cortex to ALS onset and progression, we generated a mouse line that overexpresses the mutant murine *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene but lacks one of the most important cortical output, the SubCerPN, which include the CSN. We crossbred *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, a well-established model of ALS (Dupuis et al., 2004; Ripps et al., 1995; Rouaux et al., 2007), to mice knocked out for the gene encoding the transcription factor *Fezf2* and that develop in absence of cortical layer V SubCerPN (Hirata et al., 2004; Molyneaux et al., 2005) (Fig. 1A). We ran two waves of crossbreeding (Fig. 1A) to obtain four genotypes of interest: *Fezf2*<sup>+/+</sup>; non-transgenic animals (*WT*), *Fezf2*<sup>-/-</sup>; non-transgenic animals (*KO*), *Fezf2*<sup>+/+</sup>; *Sod1*<sup>G86R</sup> animals (*Sod1*) and *Fezf2*<sup>-/-</sup>; *Sod1*<sup>G86R</sup> animals (*KO / Sod1*) (Fig. 1A). To confirm the absence of CSN, amongst other SubCerPN, we performed retrograde labelling of this population, by injection of Fluorogold in the cervical portion of the spinal cord of 75 day-old animals. As expected, microscopy analysis of sagittal sections revealed labelled pyramidal cells in the cerebral cortex of *WT* and *Sod1* mice and not in that of *KO* and *KO / Sod1* mice (Fig. 1B).

### Absence of SubCerPN delays disease onset and death

To examine the consequences of the absence projections from the cerebral cortex to its main subcerebral targets, we assessed and compared general clinical parameters of *KO* and *KO / Sod1* mice and their controls. Weight loss is a hallmark of ALS and weight loss is negatively correlated with survival in ALS patients (Dupuis et al., 2011). Similarly, *Sod1* mice start losing weight before onset of motor deterioration and weight maintenance is positively correlated with their survival (Dupuis et al., 2004). *Fezf2* deficient mice present smaller weight gain

compared to wild type mice (Hirata et al., 2004), a condition that could per se be detrimental in a context of ALS. Weight analysis of 75 day-old animals confirmed that *KO* animals were indeed lighter than *WT* animals, and revealed, as expected, that *KO/Sod1* were also lighter than *Sod1* animals. At this age, we observed no difference either between *Sod1* and *WT* or between *KO/Sod1* and *KO* mice (Fig. 2A). Long-term weight follow-up showed that both *WT* and *KO* mice regularly gained weight, but that *Sod1* and *KO/Sod1* mice instead stopped gaining weight prematurely (Fig. 2B). This arrest of weight gain, or peak of weight, is often considered as disease onset in ALS mouse models (Boillee et al., 2006; Dupuis et al., 2004). *KO/Sod1* mice presented a significant delay of disease onset compared to their *Sod1* littermates (Median: 107.5 days vs 159 days;  $p=0.0070$ ) (Fig. 2C). Similarly, the survival of the *KO/Sod1* mice was increased compared to the *Sod1* mice (Median: 130 days vs 183 days;  $p=0.0083$ ) (Fig. 2D), but the overall disease duration was not significantly different between the two genotypes (Fig. 2E). Finally, the weight loss during the course of the disease was significantly smaller for the *KO/Sod1* mice than it was for the *Sod1* mice ( $36.45 \pm 1.82\%$  vs  $25.07 \pm 1.68\%$ ;  $p<0,0001$ ) (Fig. 2E), in accordance with an arrest of weight gain rather than a clear weight loss (Fig. 2B), and an increased survival. Together, the data indicate that, in a mouse model of ALS, absence of SubCerPN is beneficial as it delays disease onset and death.

### **Absence of SubCerPN attenuates motor impairment**

We next tested whether absence of SubCerPN could also ameliorate motor performances, and more particularly muscle strength, assessed by grip and inverted grid tests, motor coordination, assessed by on accelerating rotarod and gait, assessed by CatWalk (Fig. 3). On the grip test and rotarod, *WT* and *KO* mice displayed similar performances and maintained them over time (Fig. 3A, B). *Sod1* and *KO/Sod1* mice instead rapidly showed decreased

performance, but *KO/Sod1* mice were affected later (Fig. 3D, E) and maintained higher performances over time than their *Sod1* littermates (Fig. 3A, B). On inverted grid, *KO* and *KO/Sod1* mice initially displayed more difficulty in opposing their gravitational force compared to *WT* and *Sod1* mice, and this in spite of their smaller weight (Fig. 3D). Yet, while *WT* and *KO* animals maintained their hanging time throughout all the repetitive assessments, *Sod1* and *KO/Sod1* saw their performances gradually decreasing (Fig. 3D). Again, the impairment rate of *KO/Sod1* was milder than that of *Sod1*, and by disease end stage *KO/Sod1* were performing better than the *Sod1* (Fig. 3D). Because *KO* and *KO/Sod1* mice displayed initially a smaller weight, and because *Sod1* and *KO/Sod1* lost weight during the course of the disease, we further ran linear regression analysis using the weight as a co-variable in order to better compare the performances of the different group of animals (Fig. 3G and Supplementary Table. 1 and Supplementary Fig. 1). We ran two series of three comparisons: *WT vs Sod1*, *WT vs KO*, and *KO vs KO / Sod1*, both at the time when the experiment was initiated (Origin, Supplementary Table. 1) and over the course of the experiment (Slope, Fig. 3G and Supplementary Table. 1). Linear regression analyses of the grip strength, and inverted grid test, indicated that significant differences existed between the *WT* and *KO* animals initially (Origin, Supplementary Table 1,  $p < 0.001$ ), but that over time they evolved in a similar manner (Fig. 3G and Slope, Supplementary Table 1, NS). Such differences were expected given that absence of SubCerPN implies absence of corticospinal neurons and mild modifications of the motor behaviour in mice, without evolution over time. Importantly, linear regression analyses of the grip strength, the Rotarod and the inverted grid data, over time, indicated significant differences between *KO* and *KO / Sod1* animals further confirming that absence of SubCerPN softened motor deterioration in mice (Fig. 3G). Finally we used similar linear regression analyses on the numerous parameters provided by the CatWalk gait

analysis device (Fig. 3G and Supplementary Table. 1 and Supplementary Fig. 1), using not only the weight as a covariate, but also the speed, given that it has been shown to greatly influence other parameters (Batka et al., 2014). We identified 10 parameters that were ameliorated by the absence of SubCerPN under *Sod1*<sup>G86R</sup> overexpression conditions (Fig. 3G, *Sod1* vs *KO* / *Sod1*). Of those, four were not affected by the sole absence of SubCerPN (Fig. 3G, *WT* vs *KO*, Supplementary Table. 1 and Supplementary Fig. 1) and suggest a genuine beneficial effect as opposed to a simple compensation of the effects. These are the Run Average Speed, Four Paws Print Length, Number of Steps and Print Position of the Right Paws (Fig. 3G). Taken in its whole, this set of functional data indicates that absence of SubCerPN limits motor decline in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS.

#### **Absence of CSN does not modify the pathological hallmarks of ALS in the spinal cord but decreases neuromuscular junction denervation**

To better understand how absence of SubCerPN could be beneficial in the neurodegenerative context of ALS, we further investigated the spinal cord of end-stage animals, for its relevance in ALS but also as the target of corticospinal neurons, a subpopulation of SubCerPN. To this aim, we ran series of immunolabellings on coronal sections of lumbar spinal cords harvested from end-stage animals and their age-matched control littermates (Fig. 4). Staining for the astrogliosis and microgliosis markers GFAP and IBA1 revealed reactive gliosis in the lumbar spinal cord of end-stage *Sod1* and *KO* / *Sod1* animals (Fig. 4A, B), but no difference could be observed between these two genotypes. Labelling of the autophagy flux marker P62/SQTM1 revealed a healthy, homogeneous cytoplasmic labelling in both *WT* and *KO* mice, and large, stellate-like inclusions in the spinal cords of *Sod1* and *KO* / *Sod1* mice (Fig. 4C), with similar occurrence and intensity between the two genotypes. Finally immunolabelling and counting



of the Chat-positive motor neurons present in the ventral horn of the lumbar spinal cord revealed a mild decrease of the somas of these neurons by disease end-stage in *Sod1* mice (Fig 4D, E), as we previously reported (Marques et al., 2019a; Rouaux et al., 2007), but no significant difference between the two populations (Fig 4D, E). Spinal motor neuron loss in ALS follows a Wallerian degeneration with an initial denervation of the neuromuscular junctions (NMJ), followed by a retrograde deterioration of the axon and eventually a shrinkage and loss of the soma (Fischer et al., 2004). Thus, to further test whether the mitigation of the motor impairments displayed by *KO / Sod1* mice in comparison with the *Sod1* mice reflected the state of the NMJ, we labelled the NMJ of the tibialis anterior muscle of end-stage *Sod1* and *KO / Sod1* mice along with their aged-matched *WT* and *KO* littermates (Fig. 4F, G). Rating of the NMJ integrity into three categories, innervated, partly denervated and fully denervated, followed by statistical analyses indicated that *KO / Sod1* animals had twice more innervated NMJ than *Sod1* animals by disease end-stage ( $23.8 \pm 4.87\%$  vs  $11.34 \pm 3.12\%$ ;  $p=0.0239$ ; Fig. 4G). As a whole, the data show that absence of spinal afferences from the motor cortex partly protects from NMJ denervation and Wallerian degeneration of the SMN, and suggest that this partial protection may be independent from local gliosis and autophagy.

### **Absence of CSN does not prevent spasticity**

Spasticity is a painful symptom, usually defined as an exaggerated stretch reflex leading to muscle hypertonia (Lance, 1980). In amyotrophic lateral sclerosis, spasticity is broadly considered as part of the pyramidal syndrome, a series of symptoms associated to the degeneration of the corticospinal neurons, or upper motor neurons (van Es et al., 2017). Yet, recent studies in patients and mice suggest that in ALS spasticity may, at least partly, also arise from the degeneration of serotonergic neurons (Dentel et al., 2013; El Oussini et al., 2017).

We thus reasoned that the mouse line that we generated could provide insights into the origin of spasticity in mouse models of ALS. First, we ran electromyographic analyses on pre-symptomatic mice aged of 80 days (assessment on the left leg) and 105 days (assessment on the right leg) in order to detect the H-reflex as a measurement of spasticity in anaesthetized mice (Lee et al., 2014) (Fig. 5A). Stimulation of the sciatic nerve and recording in the abductor digiti minimi muscle allowed to trigger an H-reflex in portions of the *Sod1* and *KO / Sod1* groups of animals, but never in the *WT* or *KO* animals. This indicates that, under our experimental conditions, H-reflex could develop only in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, independently of the presence of CSN, and that, counter-intuitively absence of CSN, *per se*, was not sufficient to trigger H-reflex (Fig. 5A). To test whether absence of CSN could influence H-reflex and spasticity occurrence, we evaluated the proportions of presymptomatic animals presenting an H-reflex in either one of the two legs tested (Fig. 5B), but no significant difference between *Sod1* and *KO / Sod1* could be seen at this age (Fischer exact test,  $p > 0.999$ ). Finally, to evaluate whether absence of CSN could impact spasticity over the course of the disease, we ran electromyographic analyses on end-stage animals and recorded the tail long lasting reflex (LLR) in awake and fully paralyzed animals, prior to harvesting (Fig. 5C-E). At end stage the *Sod1* and *KO / Sod1* groups of animals were also subdivided into spastic and non-spastic, but the relative proportions of each was not significantly different between the two genotypes (Fig. 5C, D). Among spastic animals, intensity of the response to the stimulation was not significantly different between the *Sod1* and *KO / Sod1* groups (Fischer exact test,  $p = 0.6577$ ) (Fig. 5E). Because development of spasticity has previously been linked to serotonergic neurons degeneration in the *Sod1<sup>G86R</sup>* and *SOD1<sup>G37R</sup>* mouse models of ALS (Dentel et al., 2013; El Oussini et al., 2017), we labelled and counted the number of TPH2-positive neurons present in the raphe nuclei over the course of the disease in *Sod1* and *KO / Sod1* and their *WT* and *KO* littermates (Fig. 5F-H). As previously

reported (Dentel et al., 2013), we observed a significant loss of the TPH2-positive neurons at disease end-stage in the *Sod1* mice compared to *WT* (Fig. 5H). A similar significant loss was observed at end-stage in the *KO / Sod1* mice compared to *WT*, but no significant difference was evidenced between *Sod1* and *KO / Sod1* animals (Fig. 5H). Together, the data suggest that, in mice, spasticity emergence and intensity is independent from the CSN presence, and thus cannot be read as a sign of CSN degeneration. Serotonergic neurons degeneration could thus account, at least partly, for spasticity development, and seems independent of CSN presence.

## Discussion

### ***Rodent models to assess the contribution of the cerebral cortex and its outputs to ALS***

While the origin of ALS remains a debated question (Ravits and La Spada, 2009), recent evidences from neurophysiological and pathological studies conducted on patients (Brettschneider et al., 2013a; Vucic and Kiernan, 2017) are nourishing a revival of interest for Charcot's initial view of the disease as a primarily cortical impairment (Charcot, 1869). Indeed, whether disease propagation relies on altered neuronal excitability and subsequent excitotoxicity (Vucic and Kiernan, 2017), or on prion-like propagation of misfolded proteins (Braak et al., 2013), both schools of thought converge to a common cortical origin of ALS and propagation to its targets along the corticofugal tracts (Eisen et al., 2017; Geevasinga et al., 2016b). While several clinical features support a cortical origin of the disease (Eisen et al., 1992), and recent longitudinal imaging analyses suggest a propagation of impairments along the corticofugal tracts, (Kassubek et al., 2014; Verstraete et al., 2014b), the hypothesis cannot be tested in patients. If the corticomotoneuronal system has undergone major modifications with evolution (Eisen et al., 2017), it is important to highlight as well the similarities of excitatory cortical neuron subtypes between Human and mouse (Hodge et al., 2018), and to acknowledge that the highest differences arise from the important evolution of the cortico-cortical projection neurons (commissural and associative/intrahemispheric), as opposed to the the corticofugal neurons (Hodge et al., 2018; Miller et al., 2019). Indeed, corticothalamic sub-populations and subclasses of SubCerPN, *i.e.* cortico-striatal, cortico-tectal, cortico-pontine and cortico-spinal, are well conserved between mouse and Human (reviewed in (Miller et al., 2019)), suggesting that, while not perfect, rodents may rather be good models to study the contribution of SubCerPN to ALS, and to directly test the corticofugal hypothesis.

Further supporting the appropriateness of rodents in general and mice in particular to cortical impairment in ALS, is their ability to recapitulate CSN (Handley et al., 2017; Marques et al., 2019a; Ozdinler et al., 2011; Yasvoina et al., 2013; Zang and Cheema, 2002) or SubCerP (Fil et al., 2017; Liu et al., 2016) degeneration. In that respect, we recently completed a comprehensive spatiotemporal analysis of CSN degeneration in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS, and described a loss of CSN that precedes that of SMN and even NMJ denervation, and that is also somatotopically related to SMN degeneration, suggesting that in this mouse model cortical impairment precedes SMN impairment (Marques et al., 2019a). Of further relevance to Human disease, it is noteworthy that CSN loss also starts before weight loss, pointing to the earliness of cortical impairment in these animals (Dupuis et al., 2004; Marques et al., 2019a). Thus, the model seemed appropriate to determine the role of CSN in ALS, and to test whether CSN degeneration may be detrimental to downstream SMN, by lack of protective input, or instead be beneficial by limiting the propagation of a toxic input from the motor cortex.

### ***Absence of SubCerPN delays onset and extends survival without increasing disease duration***

In this study, we sought to assess specifically the contribution of CSN and other SubCerPN to disease onset and progression in mice. To this aim, we crossbred the *Sod1*<sup>G86R</sup> and the *Fezf2*<sup>-/-</sup> mouse lines to generate a model that ubiquitously express a mutant of the murine *Sod1* gene (Ripps et al., 1995) but lacks CSN and other SubCerPN (Hirata et al., 2004; Molyneaux et al., 2005), hence challenging ALS pathological and clinical definitions. Our data indicate that absence of SubCerPN delays disease onset and increases survival without modifying disease duration. The results are highly reminiscent of a study by Thomsen and colleagues who knocked-down mutant *SOD1* transgene in the posterior motor cortex of the

*SOD1<sup>G93A</sup>* rat model of ALS (Thomsen et al., 2014). The authors chose an AAV9 virus to selectively transduce neurons. AAV9-SOD1-shRNA injections delayed disease onset and extended survival without affecting disease duration (Thomsen et al., 2014). The similarity of the results between this study and ours is particularly interesting given the broad differences of the two approaches. First, while in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, CSN degenerate long before SMN (Marques et al., 2019a), CSN degeneration is secondary to SMN loss in the *SOD1<sup>G93A</sup>* rats (Thomsen et al., 2014). Second, while *Sod1<sup>G86R</sup>* were crossed to the *Fezf2 KO* mice to prevent any direct connection between the motor cortex and its targets, the knocked-down of the *SOD1<sup>G93A</sup>* transgene in rats was undertaken to favour the maintenance of a functional pool of CSN. Together, the two sets of data suggest that absence of diseased CSN, or instead maintenance of genetically corrected CSN are equally beneficial and that *Sod1/SOD1* mutant transgene expressing CSN may be detrimental to their downstream targets. Yet, it is worth mentioning that AAV9 likely targeted all types cortical excitatory projection neurons and inhibitory interneurons, and could have contributed to correct cortical circuit dysfunctions which have been reported in the TDP-43<sup>A315T</sup> and *Sod1<sup>G93A</sup>* mouse models of ALS (Kim et al., 2017; Zhang et al., 2016), and are reminiscent to cortical hyperexcitability that characterizes ALS patients (Vucic and Kiernan, 2017). Future cell-type specific genetic ablation experiments could further inform on the contribution of individual populations of cortical neurons and glia to cortical circuit dysfunction and impairment on the downstream targets of the cerebral cortex. Such approaches have allowed to better define the contributions of SMN (Boillee et al., 2006), microglia (Boillee et al., 2006; Wang et al., 2011), astrocytes (Yamanaka et al., 2008b) and muscles (Miller et al., 2006) in ALS onset and progression. Together, these studies and ours indicate that cerebral cortex and SubCerPN may rather be involved in disease onset, while SMN and glia may rather modulate disease progression.

### ***Lack of SubCerPN limits weight loss and motor deterioration***

Far above the corticomotoneuronal axis, ALS affects the whole-body physiology and in particular energy metabolism. Weight loss of ALS patients is now acknowledged to start long before motor symptoms appearance, and massive weight loss is negatively correlated to survival (Dupuis et al., 2004; Dupuis et al., 2011; Peter et al., 2017). Energy homeostasis dysfunction is likely to arise, at least partly, from impairment of the hypothalamus, a subcortical structure implicated in food intake and weight control (Vercruysse et al., 2018). Clear hypothalamic atrophy is present in ALS patients, as well as pre-symptomatic gene carriers, and hypothalamic volume has been negatively correlated to disease onset (Gorges et al., 2017). While the hypothalamus is known to receive indirect control from the prefrontal cortex via the amygdala, it may also, at least in the rat, be under direct control of the medial prefrontal cortex via its layer V SubCerPN (Reppucci and Petrovich, 2016). It is thus possible that the cerebral cortex and its corticofugal outputs also contribute, at least partly, to weight loss in ALS. Such a scenario would require further investigation of the hypothalamus and energy metabolism of mice that lack SubCerPN.

### ***Absence of CSN limits motor decline and NMJ dismantlement without affecting spasticity***

While absence of CSN in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice is beneficial to SMN connection to their muscular targets, as observed by analysis of the NMJ and multiple motor tests, it is surprising to notice that spasticity, a broadly admitted effect of CSN degeneration onto SMN, is neither prevented nor even slightly modulated by the absence of CSN in the double transgenic animals. Indeed, spasticity is considered as part of the pyramidal syndrome, and as such, as a

sign of CSN impairment (van Es et al., 2017). Yet, this view has recently been challenged by series of studies supporting the role of serotonergic neurons in the emergence of spasticity in ALS. Decreased levels of spinal serotonin were shown to induce expression of constitutively activated 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptors by SMN, which in turn maintain persistent inward current and become hyperexcitable (Li et al., 2007; Murray et al., 2010). Degeneration of serotonergic neurons in the brainstem, and decreased levels of spinal serotonin were reported in ALS patients and mouse models (Dentel et al., 2013; El Oussini et al., 2017), and *SOD1*<sup>G37R</sup> genetic ablation from the serotonin neurons allowed altogether to prevent serotonergic neurons degeneration and to abolish spasticity (El Oussini et al., 2017). To test whether absence of SubCerPN could affect serotonergic neurons degeneration, we quantified the number of TPH2-positive neurons at different time points and observed that serotonergic neurons degeneration was independent from SubCerPN and still proceeded in the double transgenic mice. While our data do not rule out the contribution of other glutamatergic input into the spinal cord, such as the red nucleus, they clearly demonstrate that CSN are dispensable for the emergence of spasticity in ALS.

### ***Perspectives***

In this study, we demonstrated the detrimental role of the subcerbral projections arising from the whole cerebral cortex in a context of ALS. Yet, because the strategy we employed prevented the development of this broad neuronal population, it is thus possible that compensation by other nuclei have occurred. For instance, genetic ablation of the CSN in the *Celsr3/Emx1* mice was shown to induce both increased numbers of rubrospinal projections and of terminal ramification of monoaminergic axons (Han et al., 2015). Genetic ablation of



adult CSN and SubCerPN would thus be particularly informative to better understand how these neurons may contribute to disease onset and progression. While our study clearly demonstrated a detrimental role of CSN and other SubCerPN in a context of ALS, it did not inform on the nature of this detrimental effect, *i.e.* whether for instance it could arise from altered excitability and downstream glutamatergic excitotoxicity, or from potential propagation of misfolded SOD1 protein, or both. Selective silencing of, or selective transgene excision from the SubCerPN, along with a deep mechanistic analysis of the transcriptomic modifications that accompany CSN dysfunction and degeneration in ALS (Marques et al., 2019a) may in the future provide a better understanding of the role of the cerebral cortex and its outputs to ALS, and potentially unravel new therapeutic targets.

## Materials and Methods

### Animals

All animal experiments were performed under the supervision of authorized investigators and approved by the local ethical committee of Strasbourg University (CREMEAS, agreements # 00738.01). Animals were housed in the animal facility of the Faculty of Medicine of Strasbourg, with a regular 12 hours light/dark cycle, under constant conditions (21±1°C; 60% humidity). Standard laboratory food and water were accessible ad libitum throughout all experiments. BAC transgenic *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (Ripps et al., 1995) were obtained from the animal facility of the Faculty of Medicine of Strasbourg, and knockout *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice were generated by Hirata and colleagues (Hirata et al., 2004) and kindly provided by the Arlotta Lab. Mice were genotyped by PCR of genomic DNA from tail biopsies as previously described (Hirata et al., 2004; Ripps et al., 1995). *Sod1<sup>G86R</sup>* males were crossed with *Fezf2<sup>+/-</sup>* females and F1 *Fezf2<sup>+/-</sup>/Sod1<sup>G86R</sup>* males were crossed *Fezf2<sup>+/-</sup>/WT* females. The F2 generation provided four genotypes of interest: *Fezf2<sup>+/+</sup>/WT*; *Fezf2<sup>+/+</sup>/Sod1<sup>G86R</sup>*; *Fezf2<sup>-/-</sup>/WT*; *Fezf2<sup>-/-</sup>/Sod1<sup>G86R</sup>*. Males were used for survival and behavioural studies and end-stage histology. Males and females, in equal proportions, were used for H-reflex and histology at pre-symptomatic and symptomatic ages. Mice were followed daily, and disease progression was rated according to a clinical scale going from score 4 to 0, as previously described (Marques et al., 2019a). End-stage animals were euthanized upon reaching score 0, *i.e.* when they were no longer able to roll over within 10 s after being gently placed on their back (Marques et al., 2019a). Disease onset was calculated as the time of peak of body weight.

### **Motor coordination and muscle strength analysis**

For all motor tests, mice were trained for 4 weeks before test sessions. Then, mice were followed from 9 weeks of age until death, on a daily basis for general health and neurological symptoms, twice a week for body weight and muscle grip strength, and once a week for inverted grid test, accelerating rotarod performances and Catwalk. Each motor session consisted of three trials and the results represent the mean of these three trials. Motor coordination and endurance were assessed using rotarod (Ugobasile model 7650), with trials of 300 seconds composed of an acceleration period of 150 seconds (4-20 rpm) followed by constant speed period of 150 seconds. Muscle strength was measured using a strength grip meter (Bioseb, BIO-GS3). Four limbs hang test that allows measuring the ability of mice to use sustained limb tension to oppose gravitational force was used as previously described (Carlson et al., 2010; Scekcic-Zahirovic et al., 2017). Briefly, mice were placed on a cage grid, allowed to accommodate to their environment for 3-5 seconds before the grid was inverted and positioned 35cm above a receiving cage filled with 5-6 cm of bedding. The hanging time corresponds to the time the mice spent hung to the grid before dropping it. Mouse gait was analysed with the Catwalk XT (Noldus Information Technology). This automated gait analysis system allows digitalizing each individual footprint during the mouse locomotion and generates numerous parameters for quantitative and qualitative analysis of individual footprint and gait (Vergouts et al., 2015) (Supplementary Table 1). Recordings were performed under the conditions previously described (Scekcic-Zahirovic et al., 2017). Each mouse was allowed to cross freely the recording field of the runway with three independent attempts. Criteria for data collection were *i)* crossing the field in less than 10 seconds and *ii)* a walking speed variation of less than 60%.

## **Electromyography**

All recordings were performed with a standard EMG apparatus (Dantec) on mice anesthetized with a solution of ketamine (Imalgène 1000<sup>®</sup>, Merial; 90mg/kg body weight) and xylazine (Rompun 2%<sup>®</sup>, Bayer; 16mg/kg body weight) and kept under a heating mat to maintain physiological muscle temperature ( $\approx 31^{\circ}\text{C}$ ). Electrical activity was monitored on muscles of both limbs for at least 2 minutes, as previously described (Rouaux et al., 2007).

## **Tail spasticity**

Tail spasticity of end stage mice was determined and quantified as previously described (El Oussini et al., 2017). Briefly, a monopolar needle electrode (Medtronic, 9013R0312, diameter 0.3 mm) was inserted in segmental tail muscles of paralyzed mice to record reflex activity. Muscles spasms were evoked with mechanical stimulation of the tail. For quantification, signal intensities were measured before and after stimulation, using ImageJ (NIH), and the signal-to-noise ratio was calculated.

## **H-reflex recording**

H-reflex were assessed both legs (with three weeks interval) of presymptomatic mice by modifying a previously described method (Lee et al., 2014). Mice were anesthetized with a solution of ketamine (Imalgène 1000<sup>®</sup>, Merial; 90mg/kg body weight) and xylazine (Rompun 2%<sup>®</sup>, Bayer; 16mg/kg body weight) and placed on a heating pad. After unilateral exposure of the sciatic nerve, a spherical homemade stimulation electrode was placed around the nerve. A recording monopolar needle electrode (Medtronic, 9013R0312, diameter 0.3 mm) was transcutaneously placed in the abductor digiti minimi muscles and recordings were obtained with an amplifier (Digitimer Ltd, DS3). A first stimulation of 0.2ms at 0.1Hz was initially applied,

followed by gradually increasing current intensity. This protocol allowed us to find the minimal intensity to elicit a M-response and the intensity to obtain a maximal M-response, in order to fix the stimulation intensity at approximately 50% of the M-response. For each animal, we tested the presence or absence of the H-Reflex by performing 10 sciatic nerve stimulations at 0.1Hz. For each of the 10 traces, we measured the maximal amplitude (peak value – through value) of the noise, on a 1ms window between stimulation and M-Wave ( $\Delta$ Noise). We measured similarly the amplitude of the H-Reflex as the peak-through value of the recording on a 1ms window situated at the expected latency for the H-reflex, between 5 and 8ms following stimulation ( $\Delta$ Response). The mean and standard deviation of the  $\Delta$ Noise were measured from the 10  $\Delta$ Noise values obtained from the 10 successive traces for each animal, and used to calculate the Z-scores. The Z-score of each response to the stimulation site was calculated using the following equation:

$$Z - \text{score} = \frac{\Delta\text{Response} - \text{mean } \Delta\text{Noise}}{\text{standard deviation of } \Delta\text{Noise}}$$

A Z-score of 3, corresponding to a significance level of 0.001, was chosen to discriminate significant responses from non-significant ones. This conservative choice of threshold was chosen in agreement with visual inspection of the traces, to ensure that any H-Reflex response was not simply due to noise. After recording, mice were stitched and kept under a heating lamp until recovery. Mice were then monitored for recovery and subjected to daily checks. Mice were considered to display H reflex when at least one of the two legs was positive.

### **Retrograde labelling of the CSN**

CSN were labelled as previously described (Marques et al., 2019a). Briefly, animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of Ketamine (Imalgène 1000®, Merial; 120 mg/kg body weight) and Xylazine (Rompun 2%®, Bayer; 16 mg/kg body weight) solution

and placed on a heating pad. Laminectomy was performed in the C3-C4 cervical region of the spinal cord, and the dura was punctured using a pulled glass capillary lowered to the dorsal funiculus. Five pressure microinjections of 23 nl of Fluorogold (Fluorochrome) were performed on each side of the dorsal funiculus (Drummond Scientific, Nanoject II). Five days after injection, injected mice followed the histological procedure (see below).

### **Histological procedures**

Animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of Ketamine (Imalgène 1000®, Merial; 120 mg/kg body weight) and Xylazine (Rompun 2%®, Bayer; 16 mg/kg body weight), and transcardially perfused with cold 0.01 M PBS, followed by cold 4% PFA in 0.01 M PBS. Brains, spinal cords, gastrocnemius and tibialis were post-fixed in the same fixative solution overnight (nervous tissues) or for 1 hour (muscles) and stored in PBS 0.1M at 4°C until use. Fixed brains and spinal cords were cut in 40µm thick sections on a vibratome (Leica Biosystems, S2000). Fluorogold-labelled brains were mounted on slides with DPX mounting solution (Sigma-Aldrich). Immunostainings on brains and spinal cords were performed on slides at room temperature. First, sections were immersed in 3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) to remove the endogenous peroxidase activity and washed with phosphate buffered saline (PBS). Unspecific binding sites were blocked with 5% horse serum and 0,5% triton X-100 in PBS for 30 min and incubated with primary antibody overnight. After rinsing in PBS, sections were incubated biotinylated secondary antibody for 2 hours, rinsed in PBS and incubated 1 hour with the Vectasatin ABC Kit (Vector Laboratories, PK7200). Revelation was performed by incubating the sections in 0,075% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, D5905) and 0,002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50mM Tris HCl. Lumbar (L1-L4) spinal motor neurons from six nonadjacent sections spaced by 320 µm were immunolabelled using a goat anti-choline

acetyltransferase (ChAT) antibody (Merk Millipore, AB144P, 1/100) and a biotinylated donkey anti-goat IgG (Jackson, 1/500). Antibody for other spinal cord immunostainings were: mouse anti P62 (Abcam, 56416, 1/100), rabbit anti GFAP (Dako, Z0334, 1/200), goat anti Iba1 (Abcam AB5076, 1/100) and corresponding biotinylated secondary antibody (Jackson, 1/500). Serotonergic neurons of the median and dorsal raphe nuclei from individual coronal sections located at Bregma - 4.72 mm were immunolabelled with a goat anti-TPH2 antibody (Abcam, AB121013, 1/500), followed by a donkey anti-goat biotinylated secondary antibody (Jackson, 1/500). Tibialis anterior muscles were dissected into bundles and processed for immunofluorescence using a combination of rabbit anti-synaptophysin and rabbit anti-neurofilament antibodies (Eurogentec) followed by an Alexa-conjugated donkey anti-rabbit 488 (Jackson), and rhodamine conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (Sigma-Aldrich, T0195), as previously described (Marques et al., 2019a). On average 100 NMJ per animals were examined. Images were captured using an AxioImager.M2 microscope (Zeiss) equipped with a structured illumination system (Apotome, Zeiss) and a high-resolution B/W camera (Hamamatsu), and run by the ZEN 2 software (Zeiss). Experimenters blinded to the genotypes performed the neuronal counts and NMJ assessments.

### **Statistical Analysis**

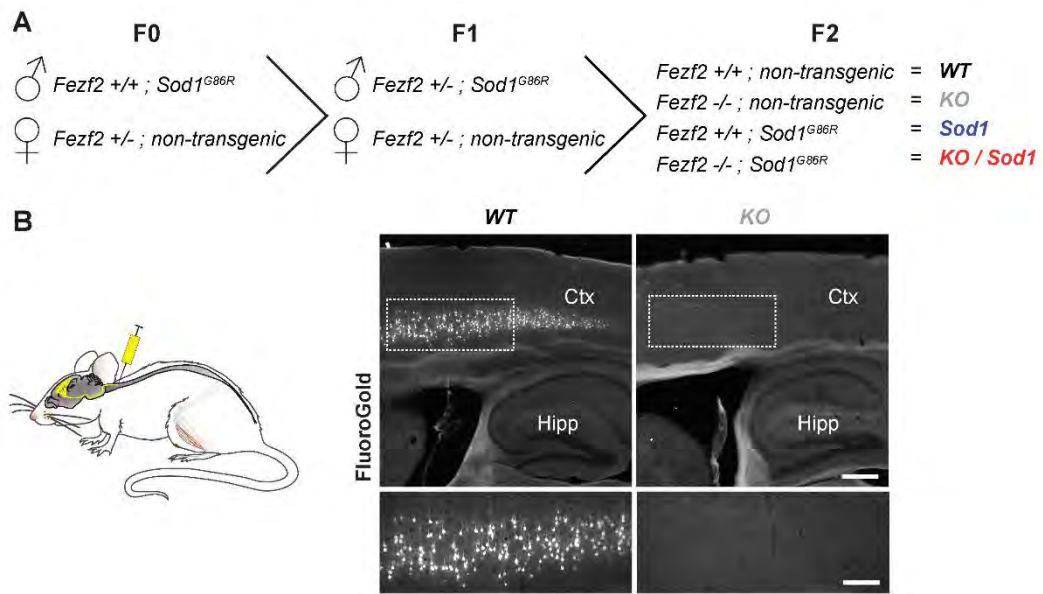
Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad, CA). For comparison between two groups, Student's t-test was used and for three or more groups, 1-way analysis of the variance followed by Tukey's multiple comparison post hoc test was applied. If there were 2 variables, we used 2-way analysis of the variance followed by Tukey's multiple comparison post hoc test was applied. For survival and disease onset analysis, animals were evaluated using log-rank

(Mantel-Cox) test. We also performed Grubbs' test also called the ESD method (extreme studentized deviate) to exclude one mouse of our survival experiment. Fischer exact test was used to determine significant different proportion. Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

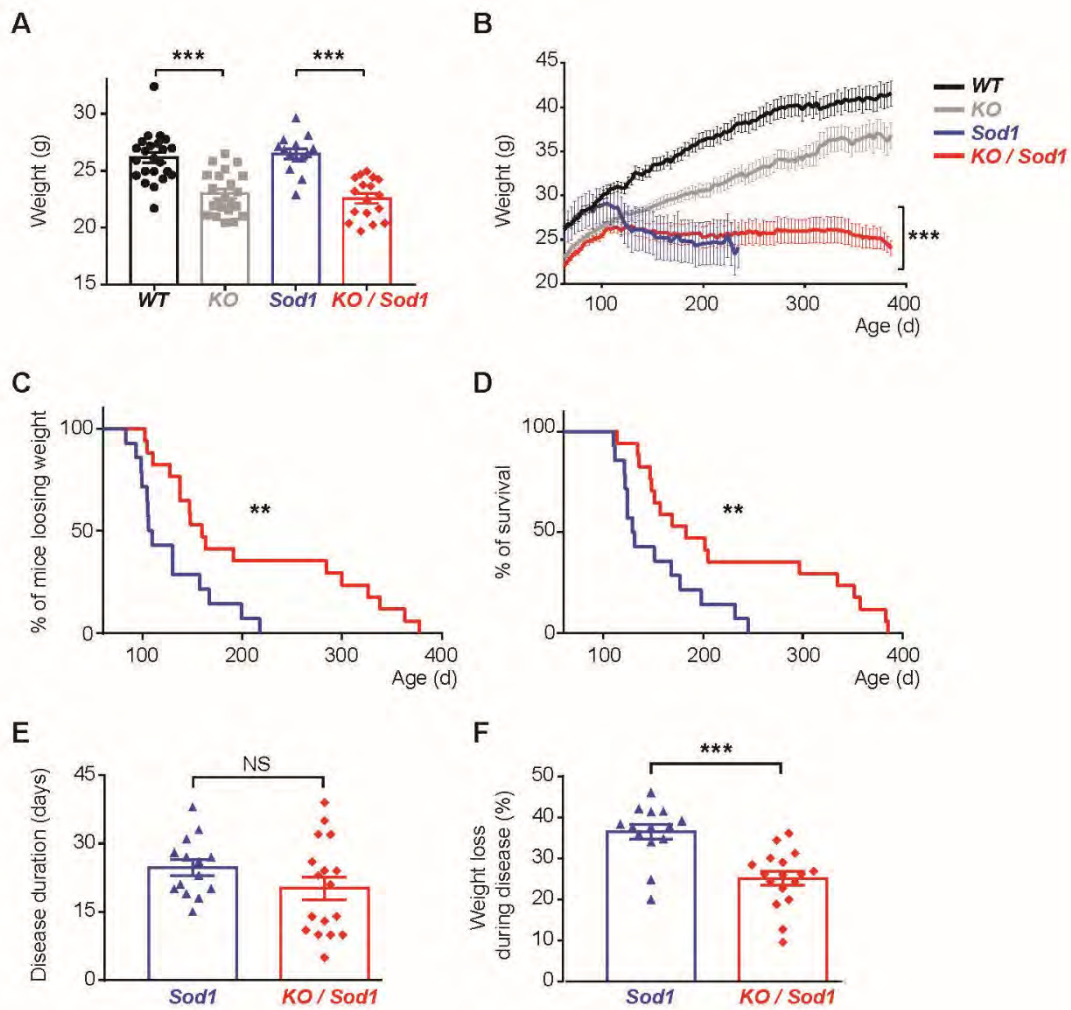


## **Acknowledgments**

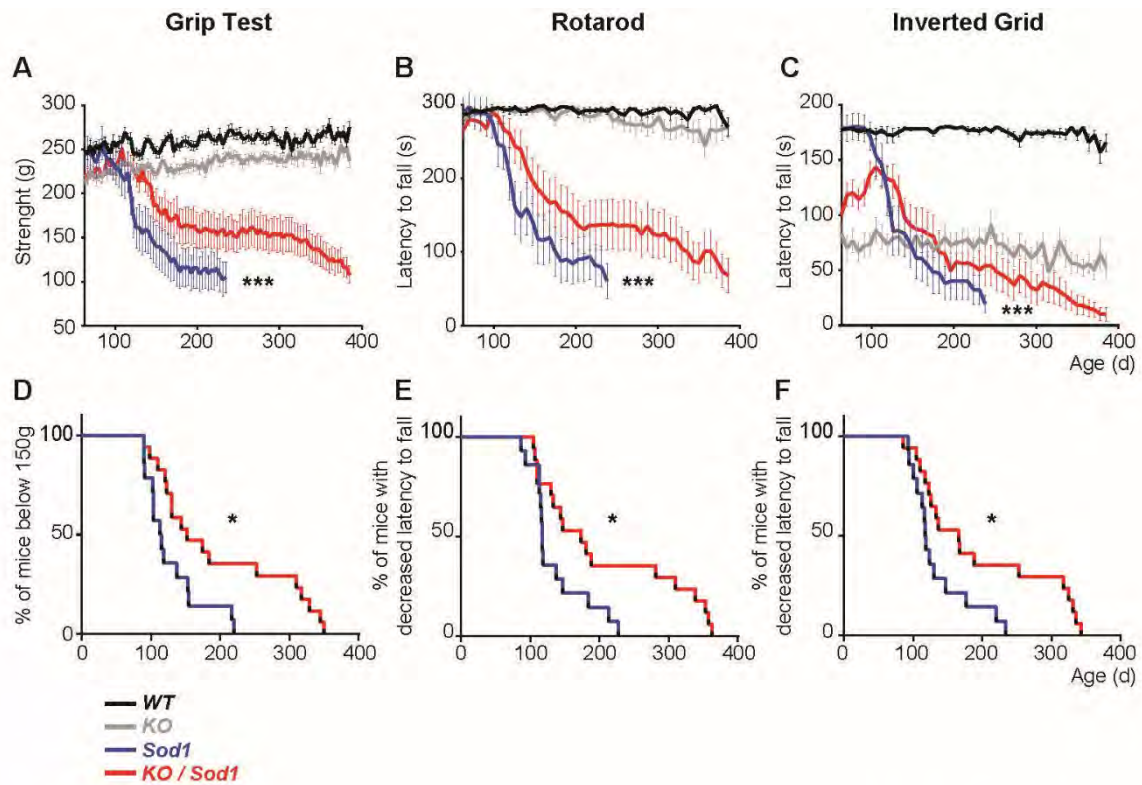
The work has been supported by an ERC starting grant #639737, a Marie Curie career integration grant #618764, an AFM-Telethon trampoline grant #16923 and a Neurex grant to CR, as well as PhD fellowships from the French Ministry of Research and the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (FRC) to TB.



**Figure 1: Generation of a mouse model overexpressing the *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene but lacking all SubCerPN, including the CSN. A.** Schematic of the crossbreeding of the *Sod1*<sup>G86R</sup> and *Fezf2*<sup>-/-</sup> mouse lines to generate four genotypes of interest: *WT*, *KO*, *Sod1* and *KO / Sod1*. **B.** As a disease-relevant subpopulation of SubCerPN, CSN were retrogradely labeled from the spinal cord (left schematic) to verify their absence from the *KO* animals (right) compared to the *WT* (left). N = 11 *WT*, 9 *KO*, 6 *Sod1* and 3 *KO / Sod1*.



**Figure 2: Absence of SubCerPN delays onset, prevents weight loss, and prolongs survival of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice.** **A.** Bar graph representing the average weight of the four groups of mice at the beginning of the survival study (75 days); \*\*\* $p < 0.001$ ; 1-way ANOVA. **B.** Graph representing the evolution of the weight over time for the four genotypes. *Sod1* mice lose weight while *KO / Sod1* mice rather stop gaining weight; \*\*\* $p < 0.001$ ; linear mixed effects model. **C-D.** Kaplan-Meier plot of onset of disease (C) and survival (D) in days, in *Sod1* and *KO / Sod1* mice. \*\* $p < 0.01$ ; log-rank (Mantel-Cox) test. **E.** Bar graph representing disease duration; Student unpaired t-test. **F.** Bar graph representing the percentage of weight loss during the course of the disease; \*\*\* $p < 0.001$ ; Student unpaired t-test. For all data,  $N = 23$  *WT*,  $22$  *KO*,  $14$  *Sod1*,  $17$  *KO / Sod1*.

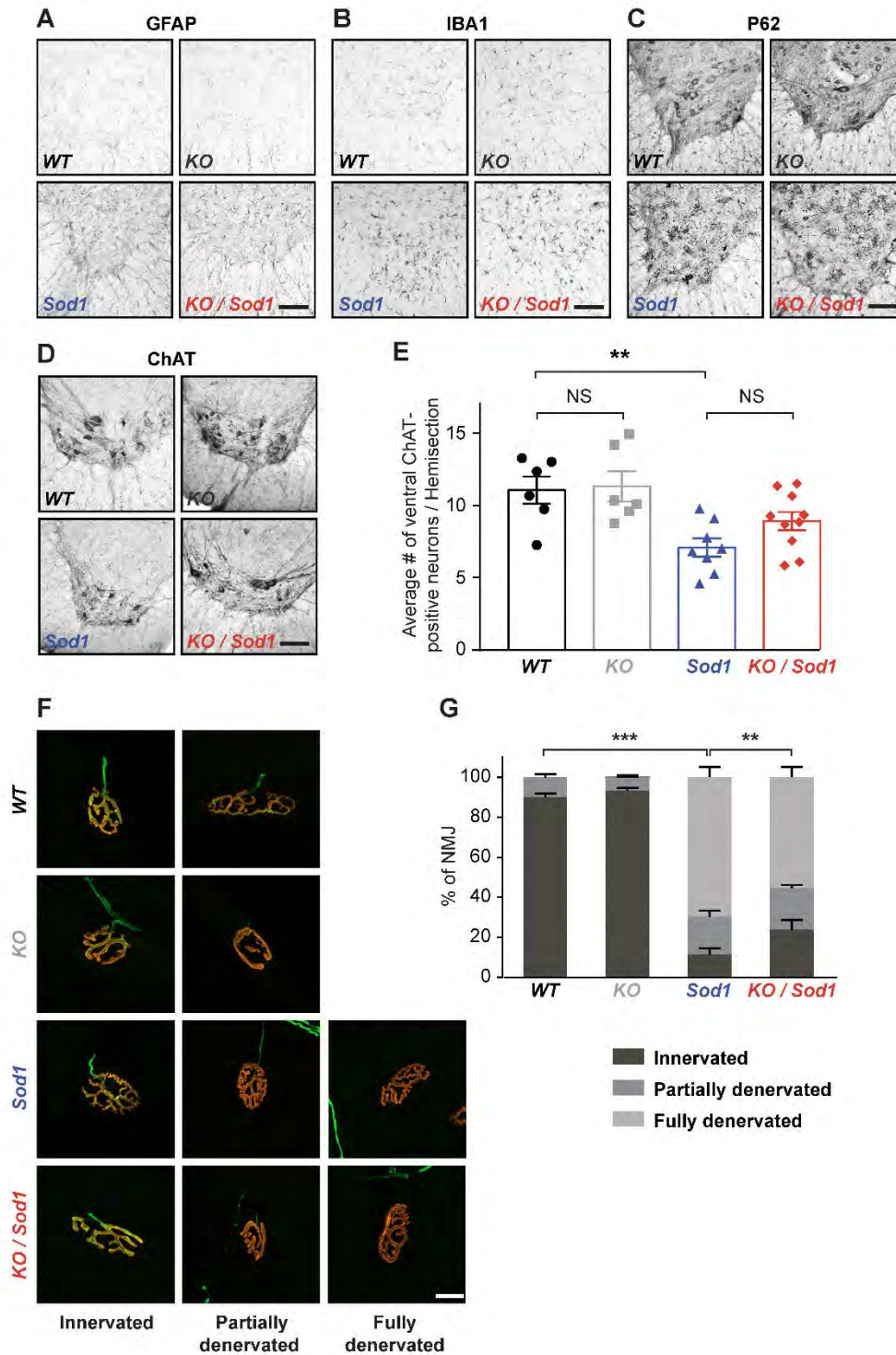


**G**

Covariates	Tests / Parameters	WT vs <i>Sod1</i>	WT vs <i>KO</i>	<i>Sod1</i> vs <i>KO / Sod1</i>
Weight	<i>Grip</i>	***	NS	***
	<i>Rotarod</i>	***	NS	**
	<i>Inverted Grid</i>	***	NS	***
Weight	<i>Run Average Speed</i>	**	NS	*
Weight & Speed	<i>4P Stand Index</i>	***	*	**
	<i>4P Max Contact Max Intensity</i>	***	**	**
	<i>4P Max Contact Mean Intensity</i>	**	***	**
	<i>4P Print Length</i>	***	NS	**
	<i>4P Max Intensity Mean</i>	**	**	**
	<i>4P Mean Intensity Mean</i>	**	***	*
	<i>4P Mean Intensity of the 15</i>	**	***	**
	<i>Number of Steps</i>	**	NS	**
	<i>Print position Right paws</i>	***	NS	***
	<i>Print position Left paws</i>	***	*	***

**Figure 3: Absence of SubCerPN delays onset of motor symptoms and slows the decline of motor capacities. A, B, C.** Evolution of motor capacities over time, in days, on the grip strength test (A), the rotarod test (B) and the inverted grid test (C); \*\*\* $p < 0.001$ ; linear mixed effects model. **D, E, F.** Kaplan-Meier plots of grip strength score below 150g (D) or decreased latency

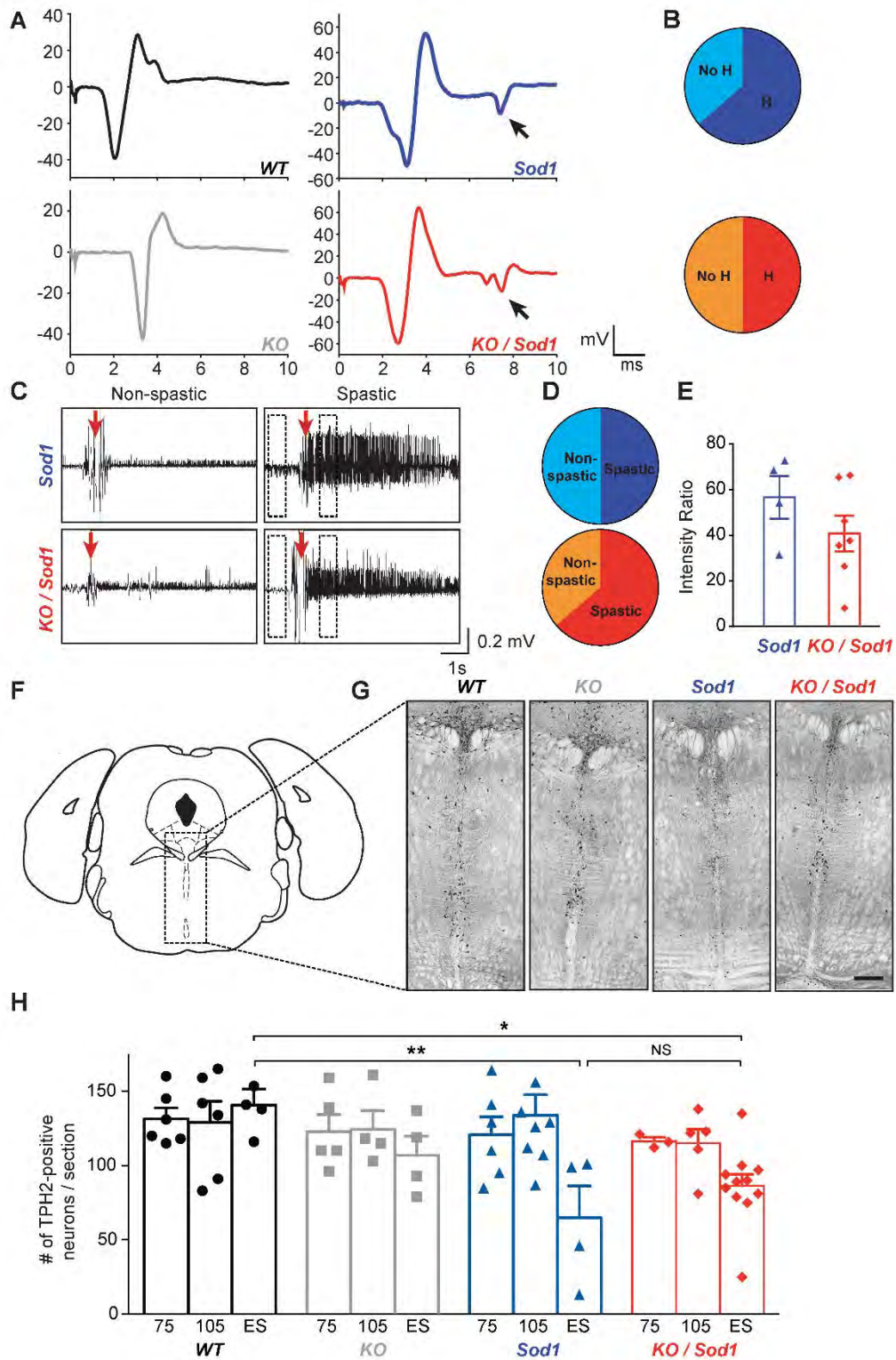
to fall on the rotarod (E) or the inverted grid test (F); \* $p < 0.05$ ; log-rank (Mantel-Cox) test. **G.** Recapitulative table of linear regression analysis of interest conducted on the various motor tests and CatWalk parameters, using either the weight, or the weight and the speed as covariates; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; NS: non-significant. For all data, N = 23 *WT*, 22 *KO*, 14 *Sod1*, 17 *KO / Sod1*.



**Figure 4: Absence of CSN does not modify the pathological hallmarks of ALS in the spinal cord, but partly protects NMJ. A, B, C.** Representative immunofluorescence images of the lumbar spinal cord ventral horn from end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their aged-matched *WT* and *KO* littermates. *Sod1* and *KO/Sod1* mice displayed an increased GFAP (**A**) and IBA1 (**B**)



immunoreactivity and P62-positive aggregates (C) compared to *WT* and *KO* mice. D. Representative images of the lumbar spinal cord ventral horn from end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their aged-matched *WT* and *KO* littermates showing Choline Acetyltransferase-positive (ChAT) neurons. E. Bar graph representing the average number of ventral ChAT-positive neurons per lumbar spinal cord hemi-section; \*\* $p < 0,01$ ; 1-way ANOVA. For all spinal cord immunostaining, N = 6 *WT*, 6 *KO*, 8 *Sod1*, 10 *KO/Sod1*. F. Representative maximum intensity projections images of z-stacks of typical innervated, partly or fully denervated neuromuscular junctions (NMJ) from end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their aged-matched *WT* and *KO* littermates. G. Bar graph representing the average proportions of innervated (dark grey), partly denervated (medium grey) and fully denervated (light grey) NMJ for each genotype; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; 2-way ANOVA. For NMJ analysis, N = 6 animals per genotype. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$  in A-D and 20  $\mu\text{m}$  in F.



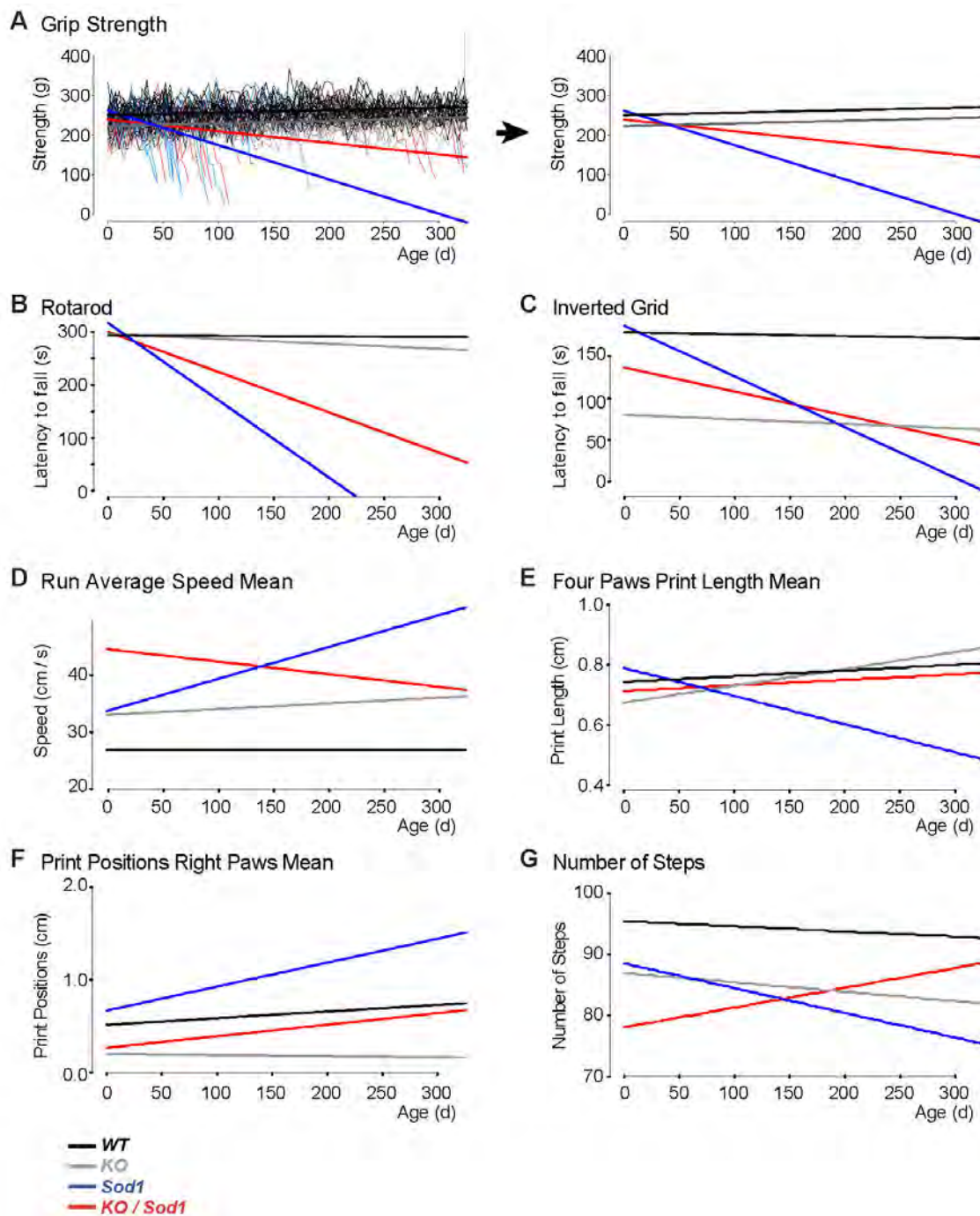
**Figure 5: Absence of CSN does not prevent or modulate spasticity.** **A.** Representative EMG traces of the muscular response in the abductor digiti minimi muscle upon sciatic nerve stimulation. Arrows indicate H-reflex in presymptomatic in *Sod1* and *KO/Sod1* mice only. N = 6 *WT*, 6 *KO*, 8 *Sod1*, 10 *KO/Sod1*. **B.** The frequency of H-reflex amongst *Sod1* (top, blue) and



*KO / Sod1* (bottom, red) animals is not significantly different between the two genotypes; Fischer exact test. **C.** Representative EMG recordings of the muscles of the tail upon stimulation in end-stage, fully paralyzed awake *Sod1* (N=8, top) and *KO/Sod1* (N=11, bottom). Spasticity-related tail long-lasting reflex (right panels) can be observed upon stimulation (red arrow) in subgroups of animals. **D.** The frequency of tail spasticity amongst the groups of end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice is not significantly different between the two genotypes; Fischer exact test. **E.** Signal-to-noise intensity ratio of the long lasting reflex does not show any significant difference between spastic *Sod1* (N = 4) and *KO/Sod1* (N = 7) mice. Student unpaired t-test. **F.** Schematic of the coronal section selected for TPH2-positive neurons labeling and counting. **G.** Representative images of TPH2 immunoreactivity in the brainstem (dorsal and median raphe) of end stage mice. **H.** Bar graph representing the average number of TPH2-positive neurons, over time (75 days, 105 days and ES), in *WT* (75, N = 6; 105, N = 6; ES = N = 4), *KO* (75, N = 5; 105, N = 4; ES = N = 4), *Sod1* (75, N = 6; 105, N = 8; ES = N = 4) and *KO / Sod1* (75, N = 3; 105, N = 5; ES = N = 11) mice. \* $p < 0,05$  and \*\* $p < 0,01$  in 2-way ANOVA followed by a Fischer multiple comparisons test. Scale bar 300  $\mu\text{m}$  in G.

Parameters	No Covariate			Covariate = Weight			Covariates = Weight + Speed					
	ORIGIN			SLOPE			ORIGIN			SLOPE		
	WT vs Sodr1	WT vs KO	Sodr1 vs KO/Sodr1	WT vs Sodr1	WT vs KO	Sodr1 vs KO/Sodr1	WT vs Sodr1	WT vs KO	Sodr1 vs KO/Sodr1	WT vs Sodr1	WT vs KO	Sodr1 vs KO/Sodr1
Grip	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Rotarod	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Inverted Grid	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Run Average Speed	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Stand Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Stand Index Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Max Contact Area Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Max Contact Area	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Max Contact Max Intensity Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Max Contact Mean Intensity Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Print Length Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Print Width Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Print Area Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Max Intensity At Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Max Intensity Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Min Intensity Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Mean Intensity Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Mean Intensity of the 15 most intense pixels Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Swing Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Swing Speed Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Stride Length Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Step Cycle Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Duty Cycle Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Single Stance Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Inital Dual Stance Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Terminal Dual Stance Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Body Speed Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 Paws Body Speed Variation Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Step sequence number of Patterns	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Step sequence CA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Step sequence CB	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Step sequence AA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Step sequence AB	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Step sequence RA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Step sequence RB	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Step sequence Regularity Index	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BOS Frontpaws	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BOS Hindpaws	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Duration Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Average Speed Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Maximum variation Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Number of Steps	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Print position Right paws Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Print position Left paws Mean	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Support Zero	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Support Single	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Support Diagonal	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Support Girdle	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Support Lateral	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Support Three	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Support Four	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

**Supplementary Table 1: Linear regression analysis of the different motor tests and CatWalk parameters.** Complete list of parameters analyzed by linear regression with either i) no covariate, ii) weight only, iii) weight and speed as covariates. Analyses were performed both when experiments were initiated (Origin) or across time (Slope; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; NS = non-significant).



**Supplementary Figure 1: Graphical representation of linear regression analyses of motor tests and CatWalk parameters of interest. A.** Linear regression analyses were used to model overall evolution of genotypes taking into account the individual progression of each mouse over time, in days. To ease visualization of the regression curves, individual mouse traces were removed (right graph). **A-D.** Representative graphs of linear regression analyses conducted on data from various motor tests and CatWalk parameters, indicating the reversion of the *Sod1* phenotype in the *KO / Sod1* animals.

## Bibliography

- Batka, R.J., Brown, T.J., McMillan, K.P., Meadows, R.M., Jones, K.J., and Haulcomb, M.M. (2014). The need for speed in rodent locomotion analyses. *Anat Rec (Hoboken)* 297, 1839-1864.
- Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389-1392.
- Braak, H., Brettschneider, J., Ludolph, A.C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Del Tredici, K. (2013). Amyotrophic lateral sclerosis--a model of corticofugal axonal spread. *Nat Rev Neurol* 9, 708-714.
- Brettschneider, J., Del Tredici, K., Toledo, J.B., Robinson, J.L., Irwin, D.J., Grossman, M., Suh, E., Van Deerlin, V.M., Wood, E.M., Baek, Y., *et al.* (2013). Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 74, 20-38.
- Briggs, F., and Usrey, W.M. (2009). Modulation of gamma-band activity across local cortical circuits. *Front Integr Neurosci* 3, 15.
- Brown, R.H., and Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 377, 162-172.
- Carlson, C.G., Rutter, J., Bledsoe, C., Singh, R., Hoff, H., Bruemmer, K., Sesti, J., Gatti, F., Berge, J., and McCarthy, L. (2010). A simple protocol for assessing inter-trial and inter-examiner reliability for two noninvasive measures of limb muscle strength. *J Neurosci Methods* 186, 226-230.
- Charcot, J.-M. (1869). Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux anterolateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Norm Pathol* 2, 354,629,744.
- Chiò, A., Pagani, M., Agosta, F., Calvo, A., Cistaro, A., and Filippi, M. (2014). Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. *The Lancet Neurology* 13, 1228-1240.
- Dentel, C., Palamiuc, L., Henriques, A., Lannes, B., Spreux-Varoquaux, O., Gutknecht, L., Rene, F., Echaniz-Laguna, A., Gonzalez de Aguilar, J.L., Lesch, K.P., *et al.* (2013). Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* 136, 483-493.
- Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.L., and Loeffler, J.P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11159-11164.
- Dupuis, L., Pradat, P.F., Ludolph, A.C., and Loeffler, J.P. (2011). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 10, 75-82.
- Eisen, A., Braak, H., Del Tredici, K., Lemon, R., Ludolph, A.C., and Kiernan, M.C. (2017). Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 917-924.
- Eisen, A., Kim, S., and Pant, B. (1992). Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve* 15, 219-224.
- El Oussini, H., Scekcic-Zahirovic, J., Vercruyse, P., Marques, C., Dirrig-Grosch, S., Dieterle, S., Picchiarelli, G., Sinniger, J., Rouaux, C., and Dupuis, L. (2017). Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 82, 444-456.
- Fil, D., DeLoach, A., Yadav, S., Alkam, D., MacNicol, M., Singh, A., Compadre, C.M., Goellner, J.J., O'Brien, C.A., Fahmi, T., *et al.* (2017). Mutant Profilin1 transgenic mice recapitulate cardinal features of motor neuron disease. *Hum Mol Genet* 26, 686-701.
- Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., and Glass, J.D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental Neurology* 185, 232-240.
- Geevasinga, N., Menon, P., Ozdinler, P.H., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2016). Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat Rev Neurol* 12, 651-661.
- Gorges, M., Vercruyse, P., Muller, H.P., Huppertz, H.J., Rosenbohm, A., Nagel, G., Weydt, P., Petersen, A., Ludolph, A.C., Kassubek, J., *et al.* (2017). Hypothalamic atrophy is related to body mass index and age at onset in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 1033-1041.
- Han, Q., Cao, C., Ding, Y., So, K.F., Wu, W., Qu, Y., and Zhou, L. (2015). Plasticity of motor network and function in the absence of corticospinal projection. *Exp Neurol* 267, 194-208.
- Handley, E.E., Pitman, K.A., Dawkins, E., Young, K.M., Clark, R.M., Jiang, T.C., Turner, B.J., Dickson, T.C., and Blizzard, C.A. (2017). Synapse Dysfunction of Layer V Pyramidal Neurons Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model of TDP-43 Proteinopathies. *Cereb Cortex* 27, 3630-3647.

Hirata, T., Suda, Y., Nakao, K., Narimatsu, M., Hirano, T., and Hibi, M. (2004). Zinc finger gene *fez*-like functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons. *Dev Dyn* 230, 546-556.

Hodge, R.D., Bakken, T.E., Miller, J.A., Smith, K.A., Barkan, E.R., Graybuck, L.T., Close, J.L., Long, B., Penn, O., Yao, Z., *et al.* (2018). Conserved cell types with divergent features between human and mouse cortex. *bioRxiv*, 384826.

Kassubek, J., Muller, H.P., Del Tredici, K., Brettschneider, J., Pinkhardt, E.H., Lule, D., Bohm, S., Braak, H., and Ludolph, A.C. (2014). Diffusion tensor imaging analysis of sequential spreading of disease in amyotrophic lateral sclerosis confirms patterns of TDP-43 pathology. *Brain* 137, 1733-1740.

Kim, J., Hughes, E.G., Shetty, A.S., Arlotta, P., Goff, L.A., Bergles, D.E., and Brown, S.P. (2017). Changes in the Excitability of Neocortical Neurons in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis Are Not Specific to Corticospinal Neurons and Are Modulated by Advancing Disease. *J Neurosci* 37, 9037-9053.

Lance, J.W. (1980). The control of muscle tone, reflexes, and movement: Robert Wartenberg Lecture. *Neurology* 30, 1303-1313.

Lee, S., Toda, T., Kiyama, H., and Yamashita, T. (2014). Weakened rate-dependent depression of Hoffmann's reflex and increased motoneuron hyperactivity after motor cortical infarction in mice. *Cell Death Dis* 5, e1007.

Lemon, R.N. (2008). Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci* 31, 195-218.

Li, X., Murray, K., Harvey, P.J., Ballou, E.W., and Bennett, D.J. (2007). Serotonin facilitates a persistent calcium current in motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *J Neurophysiol* 97, 1236-1246.

Liu, Y., Pattamatta, A., Zu, T., Reid, T., Bardhi, O., Borchelt, D.R., Yachnis, A.T., and Ranum, L.P. (2016). C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron* 90, 521-534.

Lodato, S., Shetty, A.S., and Arlotta, P. (2015). Cerebral cortex assembly: generating and reprogramming projection neuron diversity. *Trends Neurosci* 38, 117-125.

Marques, C., Fischer, M., Keime, C., Burg, T., Brunet, A., Scekcic-Zahirovic, J., and Rouaux, C. (2019). Early alterations of RNA metabolism and splicing from adult corticospinal neurons in an ALS mouse model. *bioRxiv*, 667733.

Miller, D.J., Bhaduri, A., Sestan, N., and Kriegstein, A. (2019). Shared and derived features of cellular diversity in the human cerebral cortex. *Current opinion in neurobiology* 56, 117-124.

Miller, T.M., Kim, S.H., Yamanaka, K., Hester, M., Umapathi, P., Arnsen, H., Rizo, L., Mendell, J.R., Gage, F.H., Cleveland, D.W., *et al.* (2006). Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19546-19551.

Mochizuki, Y., Mizutani, T., Shimizu, T., and Kawata, A. (2011). Proportional neuronal loss between the primary motor and sensory cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 503, 73-75.

Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., and Macklis, J.D. (2005). *Fez1* is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* 47, 817-831.

Murray, K.C., Nakae, A., Stephens, M.J., Rank, M., D'Amico, J., Harvey, P.J., Li, X., Harris, R.L., Ballou, E.W., Anelli, R., *et al.* (2010). Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Nat Med* 16, 694-700.

Ozdinler, P.H., Benn, S., Yamamoto, T.H., Guzel, M., Brown, R.H., Jr., and Macklis, J.D. (2011). Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *J Neurosci* 31, 4166-4177.

Peter, R.S., Rosenbohm, A., Dupuis, L., Brehme, T., Kassubek, J., Rothenbacher, D., Nagel, G., and Ludolph, A.C. (2017). Life course body mass index and risk and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: results from the ALS registry Swabia. *Eur J Epidemiol* 32, 901-908.

Ravits, J., Laurie, P., Fan, Y., and Moore, D.H. (2007). Implications of ALS focality: rostral-caudal distribution of lower motor neuron loss postmortem. *Neurology* 68, 1576-1582.

Ravits, J.M., and La Spada, A.R. (2009). ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology* 73, 805-811.

Reppucci, C.J., and Petrovich, G.D. (2016). Organization of connections between the amygdala, medial prefrontal cortex, and lateral hypothalamus: a single and double retrograde tracing study in rats. *Brain Struct Funct* 221, 2937-2962.

Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., Morrison, J.H., and Gordon, J.W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 689-693.

Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Menger, Y., Boutillier, A.L., and Loeffler, J.P. (2007). Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neurosci* 27, 5535-5545.

Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H.E., Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., Allmeroth, K., Dieterle, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., *et al.* (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133, 887-906.

Thomsen, G.M., Gowing, G., Latter, J., Chen, M., Vit, J.P., Staggenborg, K., Avalos, P., Alkaslasi, M., Ferraiuolo, L., Likhite, S., *et al.* (2014). Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci* 34, 15587-15600.

van Es, M.A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R.J., Veldink, J.H., and van den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 390, 2084-2098.

Vercruyse, P., Vieau, D., Blum, D., Petersen, A., and Dupuis, L. (2018). Hypothalamic Alterations in Neurodegenerative Diseases and Their Relation to Abnormal Energy Metabolism. *Front Mol Neurosci* 11, 2.

Vergouts, M., Marinangeli, C., Ingelbrecht, C., Genard, G., Schakman, O., Sternotte, A., Calas, A.G., and Hermans, E. (2015). Early ALS-type gait abnormalities in AMP-dependent protein kinase-deficient mice suggest a role for this metabolic sensor in early stages of the disease. *Metab Brain Dis* 30, 1369-1377.

Verstraete, E., Veldink, J.H., van den Berg, L.H., and van den Heuvel, M.P. (2014). Structural brain network imaging shows expanding disconnection of the motor system in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Brain Mapp* 35, 1351-1361.

Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2017). Transcranial Magnetic Stimulation for the Assessment of Neurodegenerative Disease. *Neurotherapeutics* 14, 91-106.

Wang, L., Gutmann, D.H., and Roos, R.P. (2011). Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Hum Mol Genet* 20, 286-293.

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., and Cleveland, D.W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11, 251-253.

Yasvoina, M.V., Genc, B., Jara, J.H., Sheets, P.L., Quinlan, K.A., Milosevic, A., Shepherd, G.M., Heckman, C.J., and Ozdinler, P.H. (2013). eGFP expression under UCHL1 promoter genetically labels corticospinal motor neurons and a subpopulation of degeneration-resistant spinal motor neurons in an ALS mouse model. *J Neurosci* 33, 7890-7904.

Zang, D.W., and Cheema, S.S. (2002). Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1G93A G1H transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* 332, 99-102.

Zhang, Q., Mao, C., Jin, J., Niu, C., Bai, L., Dang, J., and Zhang, M. (2014). Side of limb-onset predicts laterality of gray matter loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int* 2014, 473250.

Zhang, W., Zhang, L., Liang, B., Schroeder, D., Zhang, Z.W., Cox, G.A., Li, Y., and Lin, D.T. (2016). Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci* 19, 557-559.

# DISCUSSION

Mon travail de thèse a eu pour objectif de tester pour la première fois dans un modèle murin, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, le rôle du cortex cérébral et des NCS dans le déclenchement et la progression de la SLA. De manière plus générale, cette thèse ambitionnait aussi de replacer le cortex cérébral et les NCS au centre des recherches précliniques sur la SLA. En effet, la grande majorité des recherches précliniques se sont concentrées sur les MN et la moelle épinière en tentant de comprendre les mécanismes de leur dégénérescence tout en développant des stratégies thérapeutiques ciblées sur les MN. Ces efforts ont pour l'instant été vains, puisqu'il n'existe pas de traitement curatif de la SLA. L'orientation des recherches vers la mise en évidence du rôle des NCS et des mécanismes responsables de leur dégénérescence pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour répondre à ma problématique visant à interroger l'impact de l'absence des NCS sur le déclenchement et la progression de la SLA, il était important de choisir une préparation expérimentale adéquate. Pour cela, je vais d'abord discuter mes travaux collaboratifs au sein du laboratoire, qui ont permis de mettre en évidence la pertinence du modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>* pour étudier le cortex cérébral et les NCS. Ensuite, je reviendrai sur mes travaux de thèse étayant le rôle des NCS dans le déclenchement et la progression de la SLA.

## **1. Pertinence des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* dans le contexte de l'étude des NCS**

L'étude de l'influence du cortex cérébral et des NCS sur la SLA n'est possible que dans des modèles reproduisant fidèlement la perte combinée et sélective des NCS et des MN. Seul un nombre limité d'études ont rapporté la dégénérescence des NCS dans des modèles murins de la maladie. Les premières études ont caractérisé la perte précoce et progressive des NCS chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* et *SOD1<sup>G93A/G1H</sup>* (Ozdinler et al., 2011; Yasvoina et al., 2013; Zang and Cheema, 2002). Plus récemment, la perte des NCS a été observée dans d'autres modèles tels que les souris *TDP-43<sup>A315T</sup>* (Handley et al., 2017), *hPFN1<sup>G118V</sup>* (Fil et al., 2017), et *C9-BAC* (Liu et al., 2016). Plusieurs souches murines sont donc capables de reproduire la perte des NCS, cependant c'est dans les modèles *SOD1* qu'elle reste le mieux caractérisée.

### **1.1 Les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* récapitulent la perte des NCS et des MN ainsi que les principaux symptômes associés à la SLA**

La SLA est une maladie neurodégénérative présentant une forte hétérogénéité dans ses manifestations cliniques et dans sa génétique. La maladie peut se déclencher à des âges



et des sites très différents et l'expression des signes d'atteinte des NCS et des MN peut fortement varier. Les patients portant des mutations *SOD1* représentent environ 10% des formes familiales de SLA. Les porteurs de ces mutations sont caractérisés par un site d'apparition spinal et pour la majorité d'entre eux, les premiers signes cliniques se retrouvent dans les membres inférieurs (Millecamps et al., 2012; Swinnen and Robberecht, 2014). De manière intéressante, les patients *SOD1* présentent une hyperexcitabilité corticale, déjà présente aux stades présymptomatiques (Vucic et al., 2008). Les mutations *SOD1* furent les premières découvertes en 1993 (Rosen et al., 1993) et permirent la génération des premiers modèles murins (Philips and Rothstein, 2015). Ils récapitulent les atteintes présentes chez les patients. Pour l'heure, les modèles *SOD1* restent les mieux caractérisés mais aussi les plus utilisés.

Par rapport aux souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, (Gurney et al., 1994) qui sont les plus utilisées, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (Ripps et al., 1995) constituent un meilleur choix. En effet, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* surexpriment une forme murine du gène *Sod1*, ce qui permet de s'affranchir de la toxicité engendrée par la surexpression du gène humain, retrouvé chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*. De plus, la mutation G86R abolit l'activité enzymatique de la *SOD1* et permet également de se défaire de cette toxicité excessive liée à l'augmentation anormale de l'activité de la protéine. Enfin, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* permettent l'utilisation de contrôles sauvages tandis que pour les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, il faut rajouter un contrôle surexprimant la forme sauvage du gène humain de la *SOD1*. Les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* récapitulent les signes typiques de la SLA retrouvés chez les patients. En effet, ces souris développent les premiers symptômes moteurs aux alentours de 90 jours, puis une paralysie s'installe progressivement conduisant à leur mort entre 105 et 110 jours. Dans ce modèle, l'apparition des symptômes se fait de manière homogène et reproductible. La perte de poids de animaux est considérée comme le début de la maladie, suivie de l'apparition des premiers symptômes moteurs, résultant de la dénervation des jonctions neuromusculaire, et finalement puis la perte des corps cellulaires des MN spinaux (Dupuis et al., 2004; Halter et al., 2010; Rouaux et al., 2007).

## **1.2 Les NCS dégénèrent de manière précoce, spatio-temporelle et somatotopique chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>***

Pour la première fois, l'étude du laboratoire à laquelle j'ai participé, a permis de mettre en évidence la dégénérescence des NCS chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (Marques et al., 2019b)

(Annexe 2, publication 1, figure 1). Ainsi, ce modèle récapitule bien la perte sélective et conjointe des NCS et des MN observées chez les patients SLA (Hammer et al., 1979; Nihei et al., 1993; Sasaki and Iwata, 1999a).

Les NCS sont organisés de façon topographique le long des axes rostro-caudal et médio-latéral du cerveau de l'Homme (Lemon, 2008; Penfield and Boldrey, 1937; Penfield and Welch, 1951) mais aussi des rongeurs (Akintunde and Buxton, 1992; Kamiyama et al., 2015; Moreno-Lopez et al., 2016) en fonction du segment de la moelle épinière qu'ils innervent. Il existe donc plusieurs sous-populations de NCS correspondants à différentes parties du corps. Ainsi, nous nous sommes demandés si la dégénérescence des NCS était homogène sur l'ensemble des populations de NCS ou si certaines populations étaient plus vulnérables que d'autres. L'injection de FluoroGold, un traceur rétrograde, dans le funicule dorsal la moelle épinière nous a permis de marquer spécifiquement les NCS au sein du cortex. L'injection à des âges différents et à des segments différents de la moelle épinière permet alors d'établir le décours spatio-temporel de la dégénérescence des populations de NCS.

Lorsque l'ensemble des populations de NCS est marqué à l'aide d'une injection dans la moelle épinière cervicale, on observe une diminution légère et précoce du nombre de NCS marqués dès le stade présymptomatique à 60 jours. Cette perte devient significative à 90 jours et s'alourdit au stade terminal de la maladie (Marques et al., 2019b) (Annexe 2, publication 1, figure 2). Ces résultats sont en accord avec les données cliniques d'électrophysiologies qui montrent un dysfonctionnement précoce des NCS dans le cortex moteur des patients SLA (Menon et al., 2015; Vucic et al., 2008). De plus, la perte des NCS n'est pas égale le long de l'axe rostro-caudal. En effet, à 90 jours, la perte se fait dans les régions les plus caudales du cortex moteur puis s'installe dans l'ensemble du cortex au stade terminal de la maladie. Il est intéressant de noter que ce sont les régions caudales qui projettent vers les MN de la moelle épinière lombaire qui sont responsables du contrôle des muscles des membres postérieurs chez les rongeurs (Kamiyama et al., 2015; Moreno-Lopez et al., 2016), et des membres inférieurs chez l'Homme (Schieber, 2007). Or, chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* se sont les muscles des membres postérieurs qui sont affectés les premiers et les MN de la moelle épinière qui dégèrent en premier. Il semblerait donc qu'il existe une relation somatotopique entre l'atteinte des muscles et la dégénérescence des MN dans la moelle épinière et des NCS dans le cortex chez les *Sod1<sup>G86R</sup>*. Cette progression au cours du temps des régions les plus caudales vers les régions rostrales pourrait être le reflet de la progression des symptômes des membres

postérieurs vers les membres antérieurs (Marques et al., 2019b). L'injection de FluoroGold dans la moelle épinière lombaire nous a permis de marquer spécifiquement la sous population de NCS impliqués dans le contrôle des muscles des membres inférieurs. Les résultats montrent une perte plus précoce, dès 60 jours, et plus importante de cette population par rapport à l'ensemble des NCS (Marques et al., 2019b). Afin d'étudier la dynamique de la dégénérescence, nous avons comparé le décours de la dégénérescence des NCS des régions caudales du cortex moteur, à celle des MN de la moelle épinière lombaire et de l'état d'innervation des jonctions musculaires d'un muscle des membres postérieurs, le tibialis antérieur. Il apparaît que les NCS sont les premiers à être affectés dans la maladie dès 60 jours. S'en suit une dénervation des jonctions musculaires à partir de 90 jours puis d'une perte des MN spinaux au stade terminal de la pathologie (Marques et al., 2019b) (Annexe 2, publication 1, figure 3).

Pris dans leur ensemble, les résultats de cette étude de notre laboratoire montrent pour la première fois que la dégénérescence des NCS suit une dynamique spatio-temporelle et récapitule la relation somatotopique entre les différentes régions du corps affectées. Ces travaux vont dans le sens des études faites chez l'Homme (Menon et al., 2015; Mochizuki et al., 1995; Ravits et al., 2007a; Zhang et al., 2014a) qui ont également décrit une relation somatotopique. Aussi, cette étude, et d'autres avant elle, dans d'autres modèles murins (Ozdinler et al., 2011; Zang and Cheema, 2002) met en évidence le caractère particulièrement précoce de la perte des NCS, précédant la dégénérescence des MN, et même l'atteinte des JNM, jusqu'alors considérée comme particulièrement précoce (Fischer et al., 2004). En dépit des critiques adressées aux modèles murins de SLA, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* semblent donc constituer un modèle pertinent pour étudier la pathologie et plus précisément l'implication des NCS.

## **2. Génération d'un modèle murin développant la SLA en l'absence de NPSC**

Ces résultats replacent les NCS au cœur de la pathologie de la SLA et vont dans le sens des observations cliniques des patients SLA qui montrent une implication précoce et même présymptomatique du cortex cérébral et des NCS (Eisen et al., 2017; Verde et al., 2017; Vucic et al., 2013). Ces études chez les patients ont permis le développement de l'hypothèse d'une origine corticale et d'une propagation corticofuge de la pathologie (Braak et al., 2013; Brettschneider et al., 2013a; Eisen et al., 2017; Kassubek et al., 2014). Selon cette hypothèse,

la maladie trouverait son origine dans le cortex moteur primaire et se disséminerait via les neurones de projection corticofuge. La pathologie peut alors se transmettre de neurones en neurones, sur de longues distances et toucher l'ensemble du système nerveux. Bien que de plus en plus d'études apportent des arguments en faveur de cette hypothèse, elle ne peut être formellement démontrée chez les patients SLA, et n'a encore jamais été éprouvée dans les modèles animaux.

Dans le cortex cérébral, il existe plusieurs populations de neurones de projections pouvant étayer l'hypothèse d'une propagation de neurone en neurone sur de longues distances. On retrouve 3 sous-types majeurs de neurones de projections dans le cortex cérébral (Molyneaux et al., 2007). 1) Les neurones à projections associatives qui envoient leurs axones au sein du même hémisphère cérébral. 2) Les neurones à projections commissurales qui envoient leurs axones vers l'hémisphère opposé via le corps calleux ou la commissure antérieure. On retrouve ces neurones dans les couches II/III, V et VI du cortex cérébral. 3) Les neurones à projections corticofuges qui envoient leurs axones en dehors du cortex cérébral. On y distingue les neurones corticothalamiques qui résident dans les couches VI (majoritaire) et V (minoritaire) et projettent vers les différents noyaux du thalamus, les neurones à projection subcérébrale qui résident dans la couche V et projettent vers le tronc cérébral et la moelle épinière. Parmi les neurones à projection subcérébrale, on distingue 3 sous-types majeurs, les neurones corticotectaux, les neurones corticopontins et les neurones corticospinaux (NCS). Cette vue simplifiée ne doit pas faire oublier qu'il existe encore d'autres populations plus hétérogènes de neurones de projections, innervant différentes régions du système nerveux (Lodato and Arlotta, 2015; Molyneaux et al., 2007).

Dans le contexte de la SLA et de l'hypothèse corticofuge, les neurones à projection subcérébrale (NPSC) apparaissent particulièrement pertinents. En effet, ces neurones sont fortement et précocement atteints par la pathologie TDP-43, et connectent des zones du système nerveux distantes (Brettschneider et al., 2013a). Pour tester la contribution des NPSC dans le déclenchement et la progression de la SLA, nous avons choisi d'utiliser les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* qui développent la SLA et de les croiser avec les souris *Fezf2<sup>-/-</sup>* qui sont dépourvues de NPSC et donc de NCS et de connexion entre le cortex et la moelle épinière (Hirata et al., 2004; Molyneaux et al., 2005) (Résultats, figure 1). Un tel modèle va à l'encontre de la définition clinique et histologique de la SLA qui s'appuie sur la dégénérescence conjointe et sélective des NCS et des MN. Le suivi quotidien de l'état clinique et le passage hebdomadaire

dans des tests moteurs a permis de comparer le déclenchement et l'évolution de la SLA chez les souris en présence ou en absence de NPSC. La batterie de tests utilisés dans cette étude a permis de couvrir plusieurs aspects cliniques. Le rotarod reste le test le plus utilisé pour mesurer les déficits moteurs chez les rongeurs. Il permet d'investiguer la coordination ainsi que l'endurance et la fatigabilité. Le test d'agrippement permet de mesurer la force musculaire développée par les animaux. Il présente l'avantage d'être très similaire au test réalisé en clinique avec les patients. Le test de la grille inversée permet également de mesurer de manière non quantitative la force des animaux à résister à la gravité et en plus de tester la coordination et la dextérité. Enfin, le catwalk est un test automatisé permettant l'évaluation de la locomotion volontaire chez les rongeurs (Brooks and Dunnett, 2009).

### **2.1 L'absence de NPSC induit des effets bénéfiques sur le déclenchement et la progression de la SLA**

Lors de cette étude, le suivi clinique des animaux a mis en évidence pour la première fois le rôle bénéfique de l'absence de NPSC dans un modèle de SLA. Pour déceler ce rôle, il était important de suivre régulièrement l'apparition des premiers symptômes avec des tests moteurs adéquats et validés (Knippenberg et al., 2010).

Le suivi hebdomadaire des performances motrices dans quatre tests différents mais complémentaires a montré un décalage de l'apparition des troubles moteurs et une réduction positive du déclin des performances motrices en l'absence de NPSC dans l'ensemble des tests (Résultats, figure 3, figure supplémentaire 1, tableau supplémentaire 1). Le test d'agrippement, le rotarod et le test de la grille inversée nous ont permis de quantifier l'évolution de la force musculaire, de la coordination et de l'endurance des souris. Ces tests font souvent l'objet de critiques quant à leur sensibilité pour détecter des altérations subtiles. Ici, malgré ces défauts, nous avons retrouvé une nette différence, indiquant un effet robuste. Nous avons également suivi l'évolution de différents paramètres relatifs à la locomotion spontanée des souris grâce au système automatisé Catwalk. Cet outil permet la mesure objective et sensible de plus d'une centaine de paramètres, statiques (ex : l'aire d'une patte) et dynamiques (ex : la vitesse), de façon longitudinale chez le rongeur. Déjà utilisé dans de nombreuses applications comme les lésions de la moelle épinière et la neurodégénérescence, il a été récemment validé dans plusieurs modèles murins de SLA (Funikov et al., 2018; Scekcic-Zahirovic et al., 2017; Vergouts et al., 2015). Lors de l'interprétation des résultats, il est

important de se défaire de l'influence du poids des animaux ainsi que de leur vitesse. En effet, il a été montré que ces deux variables corrèlent largement avec les paramètres étudiés (Batka et al., 2014). Pour ne pas tenir compte de ces influences, nous les avons modélisées et incorporées dans un modèle linéaire à effets mixtes permettant une analyse statistique plus correcte. Les résultats montrent alors que l'absence de NPSC permet l'amélioration de 10 paramètres moteurs chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, dont 4 ne sont pas simplement dus à l'absence de NCS. En plus de retarder le déclenchement de la pathologie, l'absence de NCS influence de manière positive la survie des animaux. La prolongation de l'espérance de vie des animaux démontre encore une fois l'effet bénéfique de l'absence des NCS (Résultats, figure 2). En revanche, la durée de la maladie reste la même. Ces résultats vont donc dans le sens d'un effet toxique des NCS dans un contexte de SLA, et d'un potentiel rôle précoce dans la maladie.

La SLA est maintenant considérée comme une maladie multicellulaire, impliquant des types cellulaires variés. En plus de l'implication des NCS et des MN, il est important de prendre en compte le rôle des cellules gliales, des cellules musculaires et d'autres populations neuronales comme les neurones sérotoninergiques, les neurones hypothalamiques et les interneurons. Ainsi, plusieurs études ont voulu tester la contribution de diverses populations cellulaires. L'excision génétique par un système LoxP/Cre de la *SOD1* mutée dans les MN de souris *SOD1<sup>G87R</sup>*, induit une augmentation de la survie des animaux, due à un ralentissement de la phase précoce de la maladie (Boillee et al., 2006). Les mêmes résultats sont obtenus lorsque l'on excise la *SOD1* mutée des astrocytes et des microglies, mais dans ce cas le ralentissement s'effectue dans une phase plus tardive de la maladie (Boillee et al., 2006; Wang et al., 2011; Yamanaka et al., 2008a; Yamanaka et al., 2008b). La réduction de l'expression de la *SOD1<sup>G93A</sup>* dans les cellules musculaires par siARN, ne conduit à aucun changement du déclenchement ou de la progression de la maladie (Miller et al., 2006). Enfin, des travaux portant sur la suppression de la mutation *SOD1* dans le cortex moteur de rats *SOD1<sup>G93A</sup>* par shARN, vont dans le même sens que nos résultats : retard du déclenchement et une augmentation de la survie sans augmentation de la durée de la maladie (Thomsen et al., 2014). Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que les NCS jouent un rôle dans le déclenchement de la pathologie, et qu'ils sont à ce jour l'unique population cellulaire permettant de modifier cette phase de la maladie.

## 2.2 L'absence de NPSC réduit la perte de poids au cours de la maladie

Initialement, la SLA était considérée comme une maladie neurodégénérative affectant uniquement le système moteur. Cependant, plusieurs études ont apporté des preuves d'une implication systémique, touchant l'ensemble du système nerveux mais aussi de tout l'organisme (Dupuis et al., 2011; van Es et al., 2017). En particulier, le métabolisme énergétique se retrouve fortement altéré chez les patients SLA. Les défauts de l'homéostasie énergétique induisent une perte de poids importante chez les patients et dans les modèles murins. Rétrospectivement, il s'avère que la perte de poids commence longtemps avant l'apparition des symptômes moteurs (Desport et al., 2001; Dupuis et al., 2004; Peter et al., 2017), et qu'elle est corrélée de manière négative à la sévérité de la maladie (Desport et al., 1999; Park et al., 2015). Dans les modèles murins, la perte de poids est considérée comme le repère temporel du déclenchement de la maladie (Boillee et al., 2006; Dupuis et al., 2004). Notre étude montre que l'absence de NPSC induit un retard de la perte de poids chez les souris. De plus, ces souris perdent moins de poids au cours de la maladie, alors qu'au départ, elles sont plus petites (Résultats, figure 2). Il y a donc une corrélation entre cette perte de poids réduite et l'amélioration des symptômes moteurs, ainsi que le décalage du déclenchement de la maladie et le prolongement de la survie des animaux. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude montrant que la réduction de la perte de poids au cours de la maladie, grâce à un régime alimentaire enrichi en graisse, permet également le décalage du déclenchement de la maladie, le prolongement de la survie ainsi que le maintien des MN et des JNM (Dupuis et al., 2004).

L'absence de NPSC semble donc avoir un effet bénéfique sur le déclenchement de la maladie et sur la perte de poids au cours de la maladie. Cette action inattendue sur le poids peut s'expliquer en s'intéressant à l'hypothalamus, une structure jouant un rôle important dans la prise alimentaire et la régulation du poids (Vercruysse et al., 2018), et qui se retrouve également altérée dans le modèle souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et chez les patients SLA (Gorges et al., 2017; Vercruysse et al., 2016). Les altérations sont retrouvées dans la voie de la mélanocortine et permettent de faire le lien avec les problèmes de prises alimentaires et de perte du contrôle de la prise de poids chez les souris et les patients SLA (Vercruysse et al., 2016). Si l'expression de *Fezf2* a également été mise en évidence dans les progéniteurs neuronaux de l'hypothalamus, les souris *Fezf2<sup>-/-</sup>* ne présentent pas de défaut de développement de cette

structure (Hirata et al., 2004). La réponse est donc peut-être davantage dans l'existence possible de connexions directes entre le cortex préfrontal médian et l'hypothalamus latéral, telles qu'elles ont récemment été démontrées chez le rat (Reppucci and Petrovich, 2016). Ces connexions entre le cortex préfrontal médian et l'hypothalamus latéral sont assurées par les neurones de la couche V (Reppucci and Petrovich, 2016). Il serait donc intéressant de vérifier si cette sous-population de NPSC est bien absente chez les souris *Fezf2*<sup>-/-</sup>, et de déterminer plus spécifiquement son rôle dans le contrôle de la prise alimentaire et du maintien du poids.

### 2.3 L'absence de NPSC n'empêche pas le développement de la maladie

Malgré l'observation d'effets bénéfiques sur le déclenchement de la maladie, il n'en demeure pas moins que la maladie s'installe, progresse et cause la mort des animaux. La survie des animaux en l'absence de NPSC est prolongée mais la durée de maladie reste la même. Nous avons donc regardé chez les souris au stade terminal de la maladie, quel était l'état des MN dans la moelle épinière et les jonctions neuromusculaires. Lorsque l'on s'intéresse au MN spinaux lombaires, on observe une légère protection chez les souris n'ayant pas de NPSC. Cette tendance n'est pas significative au niveau spinal. En revanche, au niveau du muscle, on observe une protection significative de l'état d'innervation des jonctions neuromusculaire (Résultats, figure 4). Cette protection pourrait notamment expliquer le déclin moindre chez ses souris et leurs meilleures performances aux tests moteurs, mêmes aux derniers stades de la maladie. Le fait que les MN ne soient pas significativement protégés alors que les jonctions neuromusculaires le sont, peut s'expliquer par le phénomène de réinnervation. En effet, au cours de l'établissement de la SLA et de la dénervation progressive des jonctions neuromusculaires, les MN résistants à la dégénérescence tentent de recréer de nouvelles jonctions neuromusculaires par le biais d'une réinnervation des fibres musculaires. Ce phénomène commence même à des stades présymptomatiques, chez les patients et dans les modèles *SOD1*<sup>G93A</sup> et *SOD1*<sup>G37R</sup> (Bruneteau et al., 2013; Martineau et al., 2018; Rocha et al., 2013; Sharp et al., 2018). De plus, on observe chez les patients ayant une progression lente et une espérance de vie prolongée, une plus forte proportion de réinnervation que chez les patients mourants rapidement (Bruneteau et al., 2013). Il se pourrait donc qu'en l'absence de NCS, le phénomène de réinnervation soit maintenu ou plus efficace. Cette protection au niveau des jonctions neuromusculaires pourrait ainsi expliquer l'amélioration des symptômes moteurs observée chez les souris n'ayant pas de NPSC.



Cependant, l'absence de connexion entre le cortex cérébral et la moelle épinière n'empêche ni la dénervation ni la perte des MN, et la paralysie progressive s'installe indéniablement chez les souris *Sod1*<sup>G86R</sup>. De plus, cette dégénérescence est toujours accompagnée par la mise en place d'une réponse inflammatoire se traduisant par une astroglie et une activation des cellules microgliales (Résultats, figure 4). Cela indique que même en l'absence de NPSC, un environnement dégénératif et délétère s'installe dans la moelle épinière et conduit à la perte progressive des MN. En outre, nos résultats montrent une absence de corrélation entre les effets bénéfiques de l'absence de NPSC et la gliose réactionnelle de la moelle épinière. En d'autres termes, si dans un contexte de SLA les NPSC s'avèrent toxiques, ça n'est probablement pas par le biais d'un mécanisme pro-inflammatoire.

#### **2.4 L'établissement de la spasticité ne dépend pas de la dégénérescence des NCS**

La spasticité est une composante majeure du syndrome pyramidal présent chez les patients SLA et qui est défini comme un marqueur de l'atteinte et de la dégénérescence des NCS. Les mécanismes physiopathologiques entraînant le développement de la spasticité sont relativement bien connus lors de lésions de la moelle épinière, en revanche, ce n'est pas encore le cas dans la SLA. Le paradigme actuel dominant définit la spasticité comme étant due à la dégénérescence progressive des NCS et à la perte de connexion entre le cortex moteur et la moelle épinière, conduisant *in fine* à l'hyperexcitabilité des MN (de Carvalho et al., 2014; Kiernan et al., 2011). Cependant, à ce jour aucune étude n'a pu prouver ce paradigme. D'autant plus, deux études récentes au laboratoire ont montré l'implication des neurones sérotoninergiques dans l'établissement de la spasticité (Dentel et al., 2013; El Oussini et al., 2017). Aussi bien chez les patients que chez les souris *Sod1*<sup>G86R</sup> et *SOD1*<sup>G37R</sup>, les neurones sérotoninergiques du noyau raphé dégénèrent et la perte des projections sérotoninergiques induit une diminution des niveaux de sérotonine dans la moelle épinière ce qui a pour conséquence l'activation constitutive des récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>2B/2C</sub> sur les MN (Dentel et al., 2013; El Oussini et al., 2017). Cette hausse de l'activation des récepteurs est connue pour activer les courants persistants entrants qui favorisent l'hyperexcitabilité des MN et provoquent la spasticité (El Oussini et al., 2017; Murray et al., 2010; Murray et al., 2011; Neumann et al., 2006). L'utilisation d'antagonistes inverses de ces récepteurs permet l'abolition de la spasticité chez les souris *Sod1*<sup>G86R</sup> et *SOD1*<sup>G37R</sup> au stade terminal de la maladie.

Chez les souris et TPH2-Cre ; Floxed*SOD1*<sup>G37R</sup>, le maintien des neurones sérotoninergiques enrayer le développement de la spasticité, accélère le déclenchement de la maladie sans modifier la survie, ce qui se traduit en une phase symptomatique plus longue et des symptômes moteurs aggravés (El Oussini et al., 2017). Ainsi, la spasticité est positivement corrélée à la sévérité de la maladie chez les souris *SOD1*<sup>G37R</sup>. Il est important de préciser que chez les patients SLA, la spasticité peut aussi avoir un rôle bénéfique, notamment à cause du maintien des fonctions motrices résiduelles. De plus, les patients spastiques ont une espérance de vie plus longue que les patients non spastiques (Adams and Hicks, 2011; Satkunam, 2003).

Le paradigme des mécanismes physiopathologiques de la spasticité a donc été récemment revisité grâce à ses études. Cependant, l'implication des NCS n'a toujours pas été démontrée. Nous avons donc voulu savoir si une spasticité pouvait s'établir chez les souris *Sod1*<sup>G86R</sup> en l'absence de NPSC et donc en l'absence du processus neurodégénératif provenant des NCS et se propageant vers la moelle épinière. Compte tenu de la précocité des atteintes des NCS dans la SLA et les souris *Sod1*<sup>G86R</sup>, nous avons d'abord tenu à évaluer la spasticité chez des souris présymptomatiques. Pour ce faire, nous avons transposé à notre modèle murin une technique utilisée en routine chez les patients SLA en clinique, la mesure du réflexe d'Hoffmann (Angel, 1963; Burke, 2016; Nielsen et al., 2007). En effet, l'altération de ce réflexe est considérée comme étant le reflet des changements spinaux et supraspinaux induisant la spasticité (Nielsen et al., 2007). Ce réflexe est établi en stimulant un nerf mixte possédant les composantes motrices et sensorielles. Cette stimulation induit une dépolarisation des fibres sensorielles, qui normalement captent l'étirement du muscle. Ces afférences vont alors stimuler en retour le MN et l'on va observer en EMG une réponse, l'onde H avec une latence plus élevée que l'onde M, provoquée par l'activation directe des MN. A l'aide de cette technique adaptée à la souris (Modol et al., 2014; Tan et al., 2012; Toda et al., 2014), nous avons mesuré la présence ou l'absence du réflexe d'Hoffmann chez des souris présymptomatiques, caractérisées par l'absence de dénervation en EMG et de tout signe clinique d'altération motrice des pattes. Chez ces souris, il n'y avait pas de signe visuel de d'une quelconque spasticité. La technique employée ne nous a pas permis de mettre en évidence la présence du réflexe d'Hoffmann chez les souris ne développant la SLA. Pour déclencher un réflexe d'Hoffmann chez une souris sauvage, il nous a fallu réaliser une pyramidotomie. En revanche, sa présence chez les souris développant la SLA témoigne d'une

hyperactivation de ce réflexe, sous-tendant l'hyperexcitabilité du MN et donc de l'établissement de la spasticité. Les enregistrements montrent que les altérations du réflexe d'Hoffmann s'établissent indépendamment de la présence ou l'absence de NPSC. C'est la première fois que de telles altérations sont enregistrées chez des souris présymptomatiques. Elles témoignent de l'établissement précoce de changements au niveau de la moelle épinière. Au stade terminal de la maladie, la spasticité s'observe aisément de façon visuelle chez les souris au niveau de la queue. Celle-ci se contracte spontanément, de façon involontaire et s'agite en l'air anormalement. La spasticité est alors mesurée par EMG sur un animal paralysé par une stimulation mécanique entraînant un réflexe de longue durée. Nos résultats montrent que la spasticité se développe même en l'absence de NPSC au stade terminal de la maladie. Chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, nos résultats indiquent que la spasticité peut très bien se développer en l'absence de dégénérescence des NCS. Il semble donc que les NCS ne jouent pas un rôle prépondérant dans l'établissement de ce phénomène pathologique contrairement à la définition du paradigme actuel de la spasticité.

Comme l'établissement de la spasticité semble se faire indépendamment de la dégénérescence des NCS, nous avons ensuite voulu confirmer l'implication des neurones sérotoninergiques (El Oussini et al., 2017) dans l'établissement de la spasticité en l'absence de NPSC. Nous avons donc quantifié le nombre de neurones sérotoninergiques dans les noyaux raphé dorsal et médian à des âges asymptomatiques, présymptomatiques et au stade final de la maladie. Les résultats des comptages récapitulent la perte des neurones sérotoninergiques au stade final de la pathologie en absence et en présence de NPSC. En revanche on n'observe pas de perte neuronale dans le noyau raphé à des âges présymptomatiques. Il apparaît donc que la dégénérescence des neurones sérotoninergiques se fait indépendamment de l'absence ou de la présence des NPSC. Ce manque d'implication des NCS dans la dégénérescence des neurones sérotoninergiques du raphé peut s'expliquer par le fait le cortex envoie des projections peu nombreuses et diffuses vers le noyau raphé et de ce fait que le noyau raphé est particulièrement épargné par la pathologie TDP-43 chez les patients SLA (Brettschneider et al., 2013a). Or on sait maintenant que la connectivité entre les régions du système nerveux est importante dans le développement de la pathologie SLA. En revanche pour l'instant, rien n'explique pourquoi les neurones sérotoninergiques dégèrent dans la SLA.

L'observation précoce de la présence du réflexe d'Hoffmann chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* est en opposition aux résultats trouvés chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, où la spasticité se retrouve uniquement aux stades avancés de la maladie (Mancuso et al., 2011; Modol et al., 2014). Néanmoins, plusieurs différences sont à noter entre ces expériences. Premièrement, les modèles expérimentaux ne sont pas les mêmes et ont des progressions différentes (Gurney et al., 1994; Ripps et al., 1995). Dans les deux expériences et dans la nôtre, les animaux utilisés étaient qualifiés de présymptomatiques. Cependant, ce terme peut cacher des animaux d'âges très différents. En effet, dans les deux études sur les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, les souris étaient âgées de 8 semaines, un âge qui précède largement l'apparition des symptômes moteurs. Dans notre étude, les souris étaient âgées de 11 et 15 semaines, un âge proche de l'apparition des premiers symptômes moteur. Pour chaque souris, nous avons vérifié par EMG l'absence de tout signe d'altérations de l'activité spontanée des muscles des pattes postérieures. Cette différence peut donc expliquer les différents résultats. Il faut également noter quelques différences dans les protocoles utilisés. En effet, dans les deux études sur les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, les protocoles de stimulation utilisent des électrodes percutanées, placées au plus proche de la hanche. Dans notre cas, l'électrode entoure le nerf sciatique après son exposition, ainsi la stimulation se fait de façon plus distale. Il se peut donc que les paramètres de stimulation donnent lieu à des sensibilités différentes permettant ou non la détection du réflexe d'Hoffmann.

Les altérations du réflexe d'Hoffmann peuvent aussi être dû à des changements purement spinaux (Nielsen et al., 2007). En effet, il a été montré chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>* à un stade tardif de la maladie que des altérations au niveau des interneurons de la moelle épinière peuvent contribuer à la spasticité (Modol et al., 2014). En l'occurrence, les auteurs ont observé une diminution du nombre de cellule de Renshaw, qui en condition normale inhibe les MN et participent à l'inhibition récurrente. De plus, l'étude montre une baisse du marquage protéique de la Géphrine, une protéine postsynaptique caractéristique des synapses inhibitrice GABAergiques ou glycinergiques (Modol et al., 2014). Ces changements pourraient donc avoir tendance à augmenter l'hyperexcitabilité des MN et donc contribuer à la spasticité. Il n'est pas à exclure que dans notre modèle ces altérations soient retrouvées et participent au phénomène de spasticité.

L'étude de la spasticité dans notre modèle murin montre pour la première fois que la spasticité est un phénomène indépendant de la dégénérescence des NCS et contredit le

paradigme actuel. Néanmoins, il n'est pas exclu que d'autres populations neuronales participent à l'élaboration de la spasticité. En effet, la spasticité est en partie due à des modifications des influences inhibitrices et excitatrices supraspinales (Segal, 2018). Plusieurs noyaux moteurs du tronc cérébral, sous influences du cortex peuvent moduler l'excitabilité des MN et donc induire de la spasticité. C'est notamment le cas des neurones réticulospinaux et rubrospinaux (Bar-On et al., 2015; Mukherjee and Chakravarty, 2010; Trompetto et al., 2014). De plus, dans les cas de lésions de la moelle épinière, provoquant également de la spasticité, la noradrénaline, une autre monoamine, peut agir comme la sérotonine. En effet, les récepteurs noradrénergiques  $NA_{\alpha 1}$  présent sur les MN, participent également à la facilitation des courants entrants persistants et sont activés de façon constitutive lors de la déplétion des afférences noradrénergiques (D'Amico et al., 2014; Lee and Heckman, 2000). Cela montre donc que tout comme la sérotonine, la noradrénaline est capable de moduler l'excitabilité des MN et donc potentiellement d'induire une spasticité. Contrairement aux niveaux de sérotonines qui sont diminués dans la moelle épinière (Dentel et al., 2013), il semblerait que les niveaux de noradrénaline soient augmentés chez les patients SLA (Bertel et al., 1991) Cependant cette étude a été réalisée sur seulement 4 patients et requiert donc de rester prudent sur l'interprétation des résultats. Cette augmentation pourrait rendre les récepteurs noradrénergiques plus actifs et donc participer à l'hyperexcitabilité des MN et donc de la spasticité. De plus, une étude sur des nouveaux nés *SOD1<sup>G93A</sup>* montrent une sensibilité accrue des réseaux neuronaux spinaux à la noradrénaline (Milan et al., 2014). Il serait intéressant d'étudier la contribution des neurones noradrénergiques du locus coeruleus dans l'établissement de la spasticité.

### **3. Mécanismes physiopathologiques de la toxicité des NCS**

Les effets globalement bénéfiques de l'absence de NPSC tendent à montrer que dans le contexte de la SLA, ces neurones auraient des propriétés toxiques pour leurs cibles cellulaires. Ainsi, les NPSC propageraient la pathologie au travers de leurs projections à l'ensemble du système nerveux. Ces interprétations vont donc dans le sens de l'hypothèse d'une origine corticale et d'une propagation corticofuge émise suites à différentes observations génétiques, cliniques et histopathologiques chez les patients SLA (Braak et al., 2013; Brettschneider et al., 2013a; Eisen et al., 2017). De cette hypothèse, plusieurs

mécanismes physiopathologiques expliquant la transmission de cette toxicité ont été proposés.

### **3.1 Dissémination de protéines mal repliée et d'agrégats toxiques**

Une des marques histopathologiques retrouvées chez quasiment tous les patients SLA est la présence d'agrégats protéiques insolubles. Ces inclusions toxiques sont positives pour l'ubiquitine et sont combinées avec d'autres protéines. Parmi ces protéines, TDP-43 est celle qui est le plus souvent retrouvée, aussi bien dans les cas familiaux et sporadiques de SLA (Braak et al., 2013; Ling et al., 2013; Neumann et al., 2006). Plusieurs études dans les modèles animaux ont également montré que la protéine SOD1 est capable de former des agrégats insolubles qui précèdent l'apparition des symptômes moteurs (Gill et al., 2019). De plus en plus d'études apportent des preuves d'une possible propagation de ces agrégats toxiques de cellules en cellules. Il a notamment été émis l'hypothèse que ces agrégats se comporteraient comme des protéines de type prion et se propageraient dans le système nerveux (Maniecka and Polymenidou, 2015; Stopschinski and Diamond, 2017). Pour l'instant, seules des études *in vitro* ont permis de montrer ce comportement, notamment pour TDP-43. Les études *in vivo* n'apportent pour l'heure pas de preuves solides de ces mécanismes (Braak et al., 2017; Feiler et al., 2015; Smethurst et al., 2016). L'hypothèse corticofuge de la SLA suggère une propagation de la pathologie TDP-43 de neurone en neurone. Les agrégats TDP-43 se retrouvent uniquement dans les zones qui sont sous le contrôle direct des neurones à projections corticofuges (Brettschneider et al., 2013a). L'origine de la dissémination se retrouverait donc dans ces neurones à projections corticofuges. L'absence de NPSC chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* pourrait stopper ou du moins ralentir la dissémination de protéines mal repliées ou d'agrégats toxiques et ainsi expliquer les effets bénéfiques observés.

### **3.2 Excitotoxicité glutamatergique**

L'excitotoxicité glutamatergique est le résultat d'une activation excessive des récepteurs glutamatergiques neuronaux, entraînant une élévation importante des concentrations intracellulaires de calcium, dommageable pour le neurone. Il est possible que l'hyperexcitabilité corticale engendre une libération accrue de glutamate sur les MN et participent à leur dégénérescence (Foran and Trotti, 2009; Geevasinga et al., 2016b; Vucic et al., 2013). D'autant plus que les MN sont de par leurs caractéristiques moléculaires plus

sensibles à l'excitotoxicité glutamatergique que les autres populations de neurones. De manière intéressante, le Riluzole, le seul médicament autorisé ayant une efficacité relative, est un anti-glutamatergique. L'hyperexcitabilité est de plus un signe précoce puisqu'elle est retrouvée chez des porteurs de mutation *SOD1* présymptomatiques (Vucic et al., 2008), allant dans le sens d'une transmission antérograde du message toxique. L'absence de projections glutamatergiques des NPSC chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* pourrait expliquer les effets bénéfiques observés en réduisant la transmission glutamatergique vers la moelle épinière.

### **3.3 Propagation d'un message toxique via le noyau rouge**

Malgré les effets bénéfiques observés, la maladie se développe quand même et les souris finissent par développer une paralysie progressive, les entraînant vers la mort. La pathologie est donc toujours capable de se propager. Il est maintenant admis que la SLA n'est pas une simple maladie caractérisée par une perte sélective des NCS et des MN, mais une maladie plus complexe impliquant différents types cellulaires (van Es et al., 2017). Il est donc possible que d'autres cellules participent à la propagation d'un message toxique. Chez les souris, un des meilleurs candidats pour une propagation de la maladie du cerveau vers la moelle épinière est le noyau rouge.

Chez l'Homme le tractus corticospinal est la voie motrice descendante dominante, où 20% des axones des NCS établissent une connexion monosynaptique avec les MN (Braak et al., 2013). Chez la souris, il n'existe pas de connexion monosynaptique entre les NCS et les MN, et le système pyramidal n'est pas dominant. Le système moteur murin est caractérisé par une dominance des voies extrapyramidales (Lemon, 2008). Les neurones des voies rubrospinales, réticulospinales, vestibulospinales et tectospinales sont tous capables d'établir des connexions monosynaptiques avec les MN. Parmi ces neurones, les neurones rubrospinaux partagent de nombreuses propriétés avec les NCS (Raineteau and Schwab, 2001). Ce sont deux populations de neurones excitateurs glutamatergiques, projetant sur de longues distances vers la moelle épinière, avec une organisation somatotopique et une représentation plus importante des muscles distaux des membres que des muscles proximaux (Ayling et al., 2009; Kamiyama et al., 2015; Liang et al., 2012; Marques et al., 2019b). Chez le rat, ils montrent des profils de décharge similaires durant l'exécution de mouvements fins, suggérant qu'ils coopèrent lors de certains comportements moteurs (Hyland, 1998; Jarratt and Hyland, 1999). De plus, en cas de lésion du tractus corticospinal, le noyau rouge est

capable de compenser les pertes fonctionnelles chez les rongeurs (Han et al., 2015; Kanagal and Muir, 2009; Siegel et al., 2015) et chez les singes (Belhaj-Saif and Cheney, 2000). De plus, il existe une forte relation topographique reliant le cortex cérébral et le noyau rouge (Brown, 1974; Flumerfelt, 1980; Herz et al., 2012; Naus et al., 1985; Qian et al., 2019). Par ailleurs, le noyau rouge est sensible à la neurodégénérescence. En effet, chez les patients SLA, la pathologie TDP-43 est capable de s'installer dans le noyau rouge, potentiellement dû à la connexion entre le cortex moteur et la partie parvocellulaire du noyau rouge (Brettschneider et al., 2013a). Chez les souris *SOD1<sup>G93A</sup>*, il a été montré que les neurones rubrospinaux dégénèrent à des stades tardifs de la maladie (Zang and Cheema, 2002). Il est donc possible que chez les souris, où le noyau rouge a une forte influence au sein du système moteur, cette structure joue un rôle important dans la dissémination de la pathologie. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi la pathologie finit par se déclarer chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* en l'absence de NPSC. Il est possible que les effets bénéfiques observés résultent en partie de l'absence de connexion entre les NCS et la moelle épinière mais aussi de l'absence de connexion corticorubrale. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant en premier lieu de voir si les neurones rubrospinaux dégénèrent également chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et si oui, à quel moment dans la progression de la maladie. Dans un second temps, il serait intéressant de réaliser sélectivement l'ablation de cette population pour en observer les conséquences sur le déclenchement et la progression de la maladie.

#### **4. Limites du modèle *Fezf2*<sup>-/-</sup> / *Sod1<sup>G86R</sup>***

L'utilisation des souris déficientes pour *Fezf2* implique certaines limites inhérentes à la construction génétique. Premièrement ce sont des animaux qui se sont développés en absence d'expression d'un gène, pouvant conduire à des compensations développementales. Deuxièmement, l'expression de *Fezf2* n'est pas restreinte aux NPSC. Enfin, il est important de garder à l'esprit que ces résultats ont été obtenus chez la souris et qu'il convient de prendre en compte les différences avec l'Homme lors des interprétations.

##### **4.1 Compensations du système moteur murin**

L'absence congénitale des NPSC n'induit pas un phénotype moteur dommageable pour les souris. En effet, en dehors d'une hyperactivité mesurée en champs ouvert, les souris *KO* sont capables d'avoir une locomotion normale et n'ont pas de troubles moteurs évidents



(Hirata et al., 2004). Notre étude des capacités motrices des souris *KO* a montré que ces souris ont une force, une coordination et une endurance comparable aux souris sauvages. Au test d'agrippement, les souris développent moins de force mais cela peut être corrélé à leur poids inférieur. Au rotarod, elles performant aussi bien que les souris sauvages. En revanche, on observe un déficit moteur marqué au test de la grille inversée. De manière intrigante, les souris *KO* performant même moins bien que les souris *KO/Sod1* en phase présymptomatique. La seule explication à ce phénotype provient de l'observation des souris durant le test. Nous avons ainsi remarqué que les souris *KO* ont tendance à plus se mouvoir sur la grille comparée aux souris *KO/Sod1* qui restent immobile. Il semblerait que les souris *KO* aient plus de difficulté à positionner correctement leurs pattes pour s'accrocher à la grille et ainsi ont plus tendance à tomber lorsqu'elles changent de positions sur la grille. Ce déficit peut être le reflet de l'absence de NCS car on sait que cette population de neurones est impliquée chez la souris dans les mouvements fins des pattes nécessitant de la dextérité (Gu et al., 2017; Lemon, 2008). Cependant, aucune étude n'a testé la motricité fine et la dextérité sur ces souris. Il serait intéressant d'étudier le comportement moteur de ces souris dans des tests moteurs mettant en jeu l'utilisation des pattes avant des souris comme le test du ruban adhésif ou le test de préhension de vermicelles (Brooks and Dunnett, 2009). Il existe un autre modèle génétique similaire, les souris *Celsr3/Emx1*, qui n'ont pas de tractus corticospinal à cause de l'expression de *Celsr3* bloquant sa formation. Chez ces souris, les auteurs ont également observé une hyperactivité et ont trouvé des différences significatives dans la manière de tenir la nourriture, traduisant d'une altération de la dextérité (Han et al., 2015). Il se pourrait que l'on retrouve les mêmes résultats chez les souris déficientes pour *Fezf2*.

Ces observations montrent l'impact mineur de l'absence de NPSC chez ces souris. Ces faibles changements pourraient être dû à des compensations développementales palliant à l'absence de développement de ces neurones. Comme discuté précédemment, les NCS et leurs projections ont une importance toute relative par rapports aux projections des noyaux moteurs du tronc cérébral, qui fonctionnent en parallèle. Lors de lésions de la voie pyramidale, les voies extrapyramidales sont capables de compensations chez les rongeurs (Courtine et al., 2008; Deumens et al., 2005; Han et al., 2015; Raineteau and Schwab, 2001; Raineteau et al., 1999; Siegel et al., 2015; Wen et al., 2018). Notamment, le noyau rouge est capable de créer de nouvelles connexions vers la moelle épinière et vers les MN lors de lésion du tractus corticospinal (Ballermann and Fouad, 2006; Courtine et al., 2008; Kanagal and Muir,

2009). Aussi, toujours en cas de lésion du tractus corticospinal, le cortex est capable de créer de nouvelles connexions vers les noyaux moteurs du tronc cérébral (Noyau rouge, formation réticulée et noyaux vestibulaires) pour aller connecter la moelle épinière de façon indirecte (Z'Graggen et al., 2000; Z'Graggen et al., 1998). De façon intéressante, l'absence congénitale du tractus corticospinal conduit également à l'établissement de compensations de la part du noyau rouge. Ainsi, le noyau rouge va émettre plus de projection vers la moelle épinière. On note également une augmentation de la ramification des projections monoaminergiques (Han et al., 2015). Ces résultats laissent fortement à penser qu'il doit exister dans notre modèle des compensations développementales dues à l'absence de NPSC. Ces compensations qui pourraient passer par une augmentation des projections des noyaux moteurs du tronc cérébral vers la moelle épinière, notamment du noyau rouge, pourraient limiter les effets bénéfiques observés. Dans l'hypothèse d'une propagation d'un message toxique, une augmentation du nombre de projections vers la moelle épinière conduirait à une dissémination accrue de la pathologie et donc à un effet néfaste. L'observation dans notre modèle d'effets bénéfiques fait part de leurs robustesses.

Il est également probable que l'absence de NPSC ait affecté le développement de la moelle épinière. En effet, la présence des NCS est importante pour le développement et la maturation des réseaux de neurones spinaux (Clowry et al., 2004; Smith et al., 2017a). Chez le rat, lorsque les axones des NCS pénètrent la moelle épinière durant les premiers jours de la vie postnatale, ils participent à la formation et à la maturation des neurones spinaux, et notamment les MN (Clowry et al., 2004; Smith et al., 2017a). L'absence congénitale du tractus corticospinal chez les souris *Celsr3/Foxg1* induit une diminution du nombre de MN dans la moelle épinière et une diminution de la taille de l'arborisation des MN dans le muscle (Han et al., 2013). Les NCS murins semblent donc importants pour la survie et la maturation des MN spinaux. En revanche, une autre étude s'est intéressée aux interneurons spinaux et n'a pas constaté de changements majeurs des réseaux en l'absence de tractus corticospinal (Huang et al., 2015). Dans notre modèle, nous n'avons pas constaté de baisse du nombre de MN ni d'une dénervation des JNM chez les souris déficientes pour *Fezf2*. Il semble donc que dans notre modèle la moelle épinière soit épargnée des dommages observés dans d'autres modèles d'absence de NPSC. Cependant, nous n'avons pas vérifié l'intégrité des réseaux d'interneurones spinaux. Il est également important de noter que *Fezf2* n'est pas exprimé

dans la moelle épinière ni dans le muscle (d'après le site de l'institut européen de bio-informatique, EMBL-EBI).

#### **4.2 Compensations inhérentes à la perte d'expression de *Fezf2***

Chez les souris déficientes pour *Fezf2*, les NPSC ne sont en réalité pas supprimés, mais ils sont remplacés par une autre population neuronale projetant vers l'hémisphère contralatéral. Cette population acquiert ainsi les propriétés des neurones calleux (Molyneaux et al., 2005). Il est fort peu probable que cette population de neurones interfère avec le phénotype observé car dans les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* les neurones calleux ne dégèrent pas et ne sont pas affectés par la pathologie (Marques et al., 2019b).

*Fezf2* n'est pas seulement exprimé dans le système nerveux central. Il est également exprimé dans le thymus, la peau et l'estomac (Eckler and Chen, 2014; Hirata et al., 2004). Il est donc important de prendre en compte l'absence de *Fezf2* dans ces différents tissus lors de l'interprétation des résultats de notre étude et de l'effet bénéfique observé. Aucune étude ne s'est concentrée sur l'étude du rôle de *Fezf2* dans la peau. L'observation macroscopique de la peau des souris *Fezf2<sup>-/-</sup>* ne montre pas de signe d'atteinte évident. Bien que l'on retrouve des altérations chez la peau des patients SLA comme une élasticité anormale et une perte des fibres neuronales intra-épidermiques (Dalla Bella et al., 2016; Ono, 2000; Weis et al., 2011), il semble peu probable qu'il existe une interaction entre l'absence de *Fezf2* dans la peau et les effets bénéfiques observés. Le phénotype observé au niveau de la peau des patients ne corrèle pas avec le déclenchement, la progression et la sévérité de la maladie (Dalla Bella et al., 2016). Concernant l'expression dans l'estomac, aucune anomalie histologique n'a été observée chez les souris déficientes pour *Fezf2* (Hirata et al., 2004), mais il est vrai que les recherches n'ont pas été très exhaustives. Ces souris sont plus petites en poids mais également en taille et ont un indice de masse corporelle identique aux souris sauvages, il ne semble donc pas qu'il y ait un effet grave sur l'estomac et sur sa capacité à fonctionner et donc à interagir avec les résultats. Dans le thymus, *Fezf2* joue un rôle important dans la sélection des lymphocytes T. L'absence de *Fezf2* cause un phénotype auto-immun avec la production d'auto-anticorps et l'infiltration de cellules inflammatoires, notamment dans le cerveau (Takaba et al., 2015). On ne peut pas exclure dans notre étude un rôle bénéfique de cette inflammation, qui reste relativement modeste chez les souris déficientes pour *Fezf2*.

### 4.3 Comment outrepasser ces compensations ?

Pour outrepasser ces compensations développementales il faut trouver le moyen de sélectivement éliminer les NCS à l'âge adulte, ou du moins après qu'ils aient atteint leurs cibles dans la moelle épinière, c'est-à-dire au moins deux semaines après la naissance (Molyneux et al., 2007). Le rôle de *Fezf2* à l'âge adulte n'est pas encore élucidé (Tantirigama et al., 2016). La réalisation d'un knock-out inducible de *Fezf2* à l'âge adulte n'assurera probablement pas l'induction de la mort des NPSC. Il existe des techniques pour sélectivement éliminer une population neuronale d'intérêt, passant notamment par l'activation de l'apoptose. Il est possible d'injecter dans la moelle épinière des billes fluorescentes couplées à la chlorine e6 qui vont remonter au cortex *via* le transport rétrograde le long des axones des NCS. Une photoactivation au laser de la chlorine e6 permettra ensuite l'activation de la voie des caspases provoquant alors la mort spécifique des NCS (Brill et al., 2009; Falkner et al., 2016). Il est également possible d'utiliser des virus rétrogrades exprimant des neurotoxines sous un promoteur spécifique, comme celui de *Fezf2* (Park and Carmel, 2016). Outre l'ablation pure des NCS, il est également possible de bloquer leur activité neurophysiologique par silencing (Wiegert et al., 2017). Ainsi, la connexion entre le cortex cérébral et la moelle épinière est maintenue mais l'activité électrique des neurones est arrêtée. Cette technique est notamment intéressante pour tester l'hypothèse de l'implication de l'hyperexcitabilité corticale dans la dégénérescence des MN. Une autre approche est possible pour étudier le rôle des NCS et plus largement le rôle de l'environnement dans lequel il se trouve. Cette technique génétique est en cours de développement au laboratoire et utilise les souris *SOD1<sup>G37R</sup>* qui ont l'avantage de posséder des sites LoxP autour de la mutation de la *SOD1* (Bruijn et al., 1997). Grâce au croisement des souris *SOD1<sup>G37R</sup>* et des souris *Crym-Cre<sup>ERT2</sup>*, développées par l'institut clinique de la souris à Strasbourg pour le laboratoire, la mutation *SOD1* peut être sélectivement excisée à un instant t voulu suite à l'injection de tamoxifène. Les résultats, qui sont en cours, nous permettront de comprendre les mécanismes intrinsèques à l'expression de la *SOD1* mutée dans les NPSC. L'utilisation d'autres promoteur nous permettra également de tester le rôle et la contribution d'autres populations neuronales.

# CONCLUSION

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans un contexte où la recherche sur la SLA est en pleine évolution. La SLA n'est plus vue comme une simple maladie neurodégénérative du système moteur impliquant les NCS et les MN. Elle est maintenant considérée comme une maladie affectant plusieurs systèmes et plusieurs types cellulaires, avec une incroyable hétérogénéité. Plusieurs études chez les patients SLA ont montré l'importance du cortex cérébral et des NCS dans le déclenchement et la progression de la pathologie. Différents arguments génétiques, cliniques et histopathologiques ont permis de bâtir l'hypothèse d'une origine corticale et d'une propagation corticofuge de la SLA. Jusqu'à présent, cette hypothèse n'a jamais été prouvée et n'a jamais été testée dans les modèles murins de la SLA.

Dans ce contexte, cette thèse a permis de tester le rôle et la contribution du cortex cérébral et des NCS dans le développement et la progression de la pathologie dans un modèle murin, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Pour ce faire, nous avons tiré profit des souris *Fezf2<sup>-/-</sup>* qui se caractérisent par l'absence de NPSC et de toute connexion entre le cortex cérébral et la moelle épinière. Le croisement entre les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et *Fezf2<sup>-/-</sup>* nous a permis de générer un nouveau modèle murin développant la SLA en l'absence de NPSC, allant à l'encontre de la définition de la maladie mais permettant de remettre en question le rôle des NCS. L'étude du déclenchement et de la progression de la maladie chez ces animaux a montré que l'absence de NPSC provoque un retard de l'apparition des symptômes et préserve le déclin des capacités motrices tout en prolongeant la durée de vie des animaux. Les résultats démontrent le rôle bénéfique de l'absence des NPSC sur la maladie. Cela suggère qu'ils seraient toxiques et participeraient au déclenchement de la maladie dans le contexte de la SLA, en accord avec l'hypothèse d'une origine corticale et corticofuge, émise à partir des études menées sur les patients SLA. La contribution des NCS dans l'établissement de la spasticité étant désormais sujette à débat, ce nouveau modèle nous a permis de tester cette hypothèse. En l'absence de NPSC et de connexion entre le cortex cérébral et la moelle épinière, la spasticité est capable de se manifester. Nos résultats indiquent que ce signe attribué au syndrome pyramidal est capable de se former indépendamment de la dégénérescence des NCS.

Malgré les limites que présentent les souris *Fezf2<sup>-/-</sup>-Sod1<sup>G86R</sup>* notamment de potentielles compensations développementales et le fait que *Fezf2* n'est pas seulement exprimé dans les NCS mais aussi dans les autres neurones corticofuges et les différences entre le système moteur murin et humain, nos résultats tendent tout de même à confirmer le rôle important des NCS dans le déclenchement de la SLA. Ces résultats mettent en lumière

l'importance du cortex cérébral et des NCS et l'importance de les inclure dans les futures recherches précliniques. Pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, non plus centrées sur les MN, mais sur l'ensemble du système moteur, il sera important de comprendre comment les NCS dégénèrent, quels en sont les mécanismes, s'ils sont intrinsèques ou extrinsèques et comment la pathologie se propage au travers du système nerveux. Ces résultats pourront alors bénéficier aux patients SLA mais aussi à d'autres maladies impliquant les NCS comme la sclérose latérale primaire ou la paraplégie spastique héréditaire.

# **BIBLIOGRAPHIE**



- Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., Hamada, C., Tanaka, M., Akimoto, M., Nakamura, K., *et al.* (2017). Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* *16*, 505-512.
- Adams, M.M., and Hicks, A.L. (2011). Comparison of the effects of body-weight-supported treadmill training and tilt-table standing on spasticity in individuals with chronic spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* *34*, 488-494.
- Aggarwal, A., and Nicholson, G. (2002). Detection of preclinical motor neurone loss in SOD1 mutation carriers using motor unit number estimation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *73*, 199-201.
- Agosta, F., Galantucci, S., Riva, N., Chio, A., Messina, S., Iannaccone, S., Calvo, A., Silani, V., Copetti, M., Falini, A., *et al.* (2014). Intrahemispheric and interhemispheric structural network abnormalities in PLS and ALS. *Hum Brain Mapp* *35*, 1710-1722.
- Agosta, F., Pagani, E., Petrolini, M., Caputo, D., Perini, M., Prella, A., Salvi, F., and Filippi, M. (2010). Assessment of white matter tract damage in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a diffusion tensor MR imaging tractography study. *AJNR Am J Neuroradiol* *31*, 1457-1461.
- Agosta, F., Spinelli, E.G., and Filippi, M. (2018). Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: current and emerging uses. *Expert Rev Neurother* *18*, 395-406.
- Akintunde, A., and Buxton, D.F. (1992). Differential sites of origin and collateralization of corticospinal neurons in the rat: a multiple fluorescent retrograde tracer study. *Brain Research* *575*, 86-92.
- Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Chandran, S., Chio, A., Corcia, P., Couratier, P., Danielsson, O., de Carvalho, M., Desnuelle, C., Grehl, T., *et al.* (2017). July 2017 ENCALs statement on edaravone. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* *18*, 471-474.
- Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Nilsson, P., Chioza, B., Andersson, J.L., Russ, C., Shaw, C.E., Powell, J.F., and Leigh, P.N. (1999). Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* *8*, 157-164.
- 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., Hardiman, O., Kiernan, M.C., Chiò, A., Rix-Brooks, B., and van den Berg, L.H. (2016). Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *The Lancet Neurology* *15*, 1182-1194.
- Alexianu, M.E., Kozovska, M., and Appel, S.H. (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* *57*, 1282-1289.
- Almeida, S., Gascon, E., Tran, H., Chou, H.J., Gendron, T.F., Degroot, S., Tapper, A.R., Sellier, C., Charlet-Berguerand, N., Karydas, A., *et al.* (2013). Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol* *126*, 385-399.
- Almer, G., Guegan, C., Teismann, P., Naini, A., Rosoklija, G., Hays, A.P., Chen, C., and Przedborski, S. (2001). Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* *49*, 176-185.
- Almer, G., Teismann, P., Stevic, Z., Halaschek-Wiener, J., Deecke, L., Kostic, V., and Przedborski, S. (2002). Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology* *58*, 1277-1279.

- Alonso, A., Logroscino, G., Jick, S.S., and Hernan, M.A. (2010). Association of smoking with amyotrophic lateral sclerosis risk and survival in men and women: a prospective study. *BMC Neurol* 10, 6.
- Aloraini, S.M., Gaverth, J., Yeung, E., and MacKay-Lyons, M. (2015). Assessment of spasticity after stroke using clinical measures: a systematic review. *Disabil Rehabil* 37, 2313-2323.
- Alshikho, M.J., Zurcher, N.R., Loggia, M.L., Cernasov, P., Chonde, D.B., Izquierdo Garcia, D., Yasek, J.E., Akeju, O., Catana, C., Rosen, B.R., *et al.* (2016). Glial activation colocalizes with structural abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 87, 2554-2561.
- Alstermark, B., Ogawa, J., and Isa, T. (2004). Lack of monosynaptic corticomotoneuronal EPSPs in rats: disynaptic EPSPs mediated via reticulospinal neurons and polysynaptic EPSPs via segmental interneurons. *J Neurophysiol* 91, 1832-1839.
- Amendola, J., and Durand, J. (2008). Morphological differences between wild-type and transgenic superoxide dismutase 1 lumbar motoneurons in postnatal mice. *J Comp Neurol* 511, 329-341.
- Andersen, P.M., and Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 7, 603-615.
- Andersen, R.A., and Cui, H. (2009). Intention, action planning, and decision making in parietal-frontal circuits. *Neuron* 63, 568-583.
- Angel, R.W. (1963). The H Reflex in Normal, Spastic, and Rigid Subjects. *Archives of Neurology* 8.
- Antri, M., Orsal, D., and Barthe, J.Y. (2002). Locomotor recovery in the chronic spinal rat: effects of long-term treatment with a 5-HT<sub>2</sub>agonist. *European Journal of Neuroscience* 16, 467-476.
- Arbour, D., Tremblay, E., Martineau, E., Julien, J.P., and Robitaille, R. (2015). Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model. *J Neurosci* 35, 688-706.
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., and Macklis, J.D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45, 207-221.
- Armand, J. (1982). The Origin, Course and Terminations of Corticospinal Fibers in Various Mammals. In, pp. 329-360.
- Armon, C. (2009). Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology* 73, 1693-1698.
- Arnold, A., Edgren, D.C., and Palladino, V.S. (1953). Amyotrophic lateral sclerosis; fifty cases observed on Guam. *J Nerv Ment Dis* 117, 135-139.
- Arnold, E.S., Ling, S.C., Huelga, S.C., Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Ditsworth, D., Kordasiewicz, H.B., McAlonis-Downes, M., Platoshyn, O., Parone, P.A., *et al.* (2013). ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E736-745.
- Ash, P.E., Bieniek, K.F., Gendron, T.F., Caulfield, T., Lin, W.L., DeJesus-Hernandez, M., van Blitterswijk, M.M., Jansen-West, K., Paul, J.W., 3rd, Rademakers, R., *et al.* (2013). Unconventional translation of C9orf72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77, 639-646.
- Atanasio, A., Decman, V., White, D., Ramos, M., Ikiz, B., Lee, H.C., Siao, C.J., Brydges, S., LaRosa, E., Bai, Y., *et al.* (2016). C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production, and glomerulonephropathy in mice. *Sci Rep* 6, 23204.

- Atassi, N., Xu, M., Triantafyllou, C., Keil, B., Lawson, R., Cernasov, P., Ratti, E., Long, C.J., Paganoni, S., Murphy, A., *et al.* (2017). Ultra high-field (7tesla) magnetic resonance spectroscopy in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* *12*, e0177680.
- Atkin, J.D., Farg, M.A., Walker, A.K., McLean, C., Tomas, D., and Horne, M.K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* *30*, 400-407.
- 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.
- Ayling, O.G., Harrison, T.C., Boyd, J.D., Goroshkov, A., and Murphy, T.H. (2009). Automated light-based mapping of motor cortex by photoactivation of channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Nat Methods* *6*, 219-224.
- Bae, J.S., Simon, N.G., Menon, P., Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2013). The puzzling case of hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Neurol* *9*, 65-74.
- Bajd, T., and Vodovnik, L. (1984). Pendulum testing of spasticity. *J Biomed Eng* *6*, 9-16.
- Baker, S.N. (2011). The primate reticulospinal tract, hand function and functional recovery. *J Physiol* *589*, 5603-5612.
- Baldinger, R., Katzberg, H.D., and Weber, M. (2012). Treatment for cramps in amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004157.
- Balendra, R., and Isaacs, A.M. (2018). C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nat Rev Neurol* *14*, 544-558.
- Ballermann, M., and Fouad, K. (2006). Spontaneous locomotor recovery in spinal cord injured rats is accompanied by anatomical plasticity of reticulospinal fibers. *Eur J Neurosci* *23*, 1988-1996.
- Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chausseot, A., Genin, E.C., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., Berg-Alonso, L., Kageyama, Y., Serre, V., Moore, D.G., *et al.* (2014). A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain* *137*, 2329-2345.
- Bar-On, L., Molenaers, G., Aertbelien, E., Van Campenhout, A., Feys, H., Nuttin, B., and Desloovere, K. (2015). Spasticity and its contribution to hypertonia in cerebral palsy. *Biomed Res Int* *2015*, 317047.
- Barbas, H., and Garcia-Cabezas, M.A. (2015). Motor cortex layer 4: less is more. *Trends Neurosci* *38*, 259-261.
- Barbas, H., and Pandya, D.N. (1987). Architecture and frontal cortical connections of the premotor cortex (area 6) in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* *256*, 211-228.
- Barber, S.C., Higginbottom, A., Mead, R.J., Barber, S., and Shaw, P.J. (2009). An in vitro screening cascade to identify neuroprotective antioxidants in ALS. *Free Radic Biol Med* *46*, 1127-1138.
- Barber, S.C., and Shaw, P.J. (2010). Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* *48*, 629-641.
- Barmack, N.H. (2003). Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Research Bulletin* *60*, 511-541.
- Batka, R.J., Brown, T.J., McMillan, K.P., Meadows, R.M., Jones, K.J., and Haulcomb, M.M. (2014). The need for speed in rodent locomotion analyses. *Anat Rec (Hoboken)* *297*, 1839-1864.

- Batra, R., and Lee, C.W. (2017). Mouse Models of C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansion in Amyotrophic Lateral Sclerosis/ Frontotemporal Dementia. *Front Cell Neurosci* 11, 196.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A.A., Siklos, L., McKercher, S.R., and Appel, S.H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16021-16026.
- Beitz, A.J., and Ecklund, L.J. (1988). Colocalization of fixative-modified glutamate and glutaminase but not GAD in rubrospinal neurons. *J Comp Neurol* 274, 265-279.
- Belhaj-Saif, A., and Cheney, P.D. (2000). Plasticity in the distribution of the red nucleus output to forearm muscles after unilateral lesions of the pyramidal tract. *J Neurophysiol* 83, 3147-3153.
- Bendotti, C., Calvaresi, N., Chiveri, L., Prella, A., Moggio, M., Braga, M., Silani, V., and De Biasi, S. (2001). Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *Journal of the Neurological Sciences* 191, 25-33.
- 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.
- Beretta, S., Carri, M.T., Beghi, E., Chiò, A., and Ferrarese, C. (2003). The sinister side of Italian soccer. *The Lancet Neurology* 2, 656-657.
- Berlowitz, D.J., Howard, M.E., Fiore, J.F., Jr., Vander Hoorn, S., O'Donoghue, F.J., Westlake, J., Smith, A., Beer, F., Mathers, S., and Talman, P. (2016). Identifying who will benefit from non-invasive ventilation in amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease in a clinical cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 280-286.
- Bertel, O., Malessa, S., Sluga, E., and Hornykiewicz, O. (1991). Amyotrophic lateral sclerosis: changes of noradrenergic and serotonergic transmitter systems in the spinal cord. *Brain Research* 566, 54-60.
- Betz, W. (1874). Anatomischer nachweis zweier gehirncentra. *Zentralbl Med Wiss* 12.
- Bhimani, R., and Anderson, L. (2014). Clinical understanding of spasticity: implications for practice. *Rehabil Res Pract* 2014, 279175.
- Biering-Sorensen, F., Nielsen, J.B., and Klinge, K. (2006). Spasticity-assessment: a review. *Spinal Cord* 44, 708-722.
- Bilican, B., Serio, A., Barmada, S.J., Nishimura, A.L., Sullivan, G.J., Carrasco, M., Phatnani, H.P., Puddifoot, C.A., Story, D., Fletcher, J., *et al.* (2012). Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5803-5808.
- Bisland, L.G., Sahai, E., Kelly, G., Golding, M., Greensmith, L., and Schiavo, G. (2010). Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20523-20528.
- Blair, I.P., Williams, K.L., Warraich, S.T., Durnall, J.C., Thoeng, A.D., Manavis, J., Blumbergs, P.C., Vucic, S., Kiernan, M.C., and Nicholson, G.A. (2010). FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 639-645.
- Blanquer, M., Moraleda, J.M., Iniesta, F., Gomez-Espuch, J., Meca-Lallana, J., Villaverde, R., Perez-Espejo, M.A., Ruiz-Lopez, F.J., Garcia Santos, J.M., Bleda, P., *et al.* (2012). Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study. *Stem Cells* 30, 1277-1285.

- Bohannon, R.W., and Smith, M.B. (1987). Interrater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity. *Phys Ther* 67, 206-207.
- Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389-1392.
- Borasio, G.D., Robberecht, W., Leigh, P.N., Emile, J., Guilloff, R.J., Jerusalem, F., Silani, V., Vos, P.E., Wokke, J.H., and Dobbins, T. (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.
- Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.S., Guarnieri, M., Xu, Z.S., Wong, P.C., Brown, R.H., Jr., Price, D.L., Sisodia, S.S., and Cleveland, D.W. (1994). Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8292-8296.
- Bortoff, G.A., and Strick, P.L. (1993). Corticospinal terminations in two new-world primates: further evidence that corticomotoneuronal connections provide part of the neural substrate for manual dexterity. *The Journal of Neuroscience* 13, 5105-5118.
- Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., *et al.* (2010). Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 16, 302-307.
- Bourke, S.C., Tomlinson, M., Williams, T.L., Bullock, R.E., Shaw, P.J., and Gibson, G.J. (2006). Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology* 5, 140-147.
- Boutahar, N., Wierinckx, A., Camdessanche, J.P., Antoine, J.C., Reynaud, E., Lassabliere, F., Lachuer, J., and Borg, J. (2011). Differential effect of oxidative or excitotoxic stress on the transcriptional profile of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 cultured neurons. *J Neurosci Res* 89, 1439-1450.
- Bouteloup, C., Desport, J.C., Clavelou, P., Guy, N., Derumeaux-Burel, H., Ferrier, A., and Couratier, P. (2009). Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J Neurol* 256, 1236-1242.
- Bovend'Eerd, T.J., Newman, M., Barker, K., Dawes, H., Minelli, C., and Wade, D.T. (2008). The effects of stretching in spasticity: a systematic review. *Arch Phys Med Rehabil* 89, 1395-1406.
- Bowen, B.C., Pattany, P.M., Bradley, W.G., Murdoch, J.B., Rotta, F., Younis, A.A., Duncan, R.C., and Quencer, R.M. (2000). MR imaging and localized proton spectroscopy of the precentral gyrus in amyotrophic lateral sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 21, 647-658.
- Braak, H., Bretschneider, J., Ludolph, A.C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Del Tredici, K. (2013). Amyotrophic lateral sclerosis--a model of corticofugal axonal spread. *Nat Rev Neurol* 9, 708-714.
- Braak, H., Ludolph, A.C., Neumann, M., Ravits, J., and Del Tredici, K. (2017). Pathological TDP-43 changes in Betz cells differ from those in bulbar and spinal alpha-motoneurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133, 79-90.
- Bradley, W.G., and Mash, D.C. (2009). Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotroph Lateral Scler* 10 Suppl 2, 7-20.
- Brahe, C., Zappata, S., Neri, G., Servidei, S., Ricci, E., and Tonali, P. (1995). Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy. *The Lancet* 346, 741-742.

- Brenner, D., Yilmaz, R., Muller, K., Grehl, T., Petri, S., Meyer, T., Grosskreutz, J., Weydt, P., Ruf, W., Neuwirth, C., *et al.* (2018). Hot-spot KIF5A mutations cause familial ALS. *Brain* *141*, 688-697.
- Brettschneider, J., Del Tredici, K., Toledo, J.B., Robinson, J.L., Irwin, D.J., Grossman, M., Suh, E., Van Deerlin, V.M., Wood, E.M., Baek, Y., *et al.* (2013a). Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* *74*, 20-38.
- Brettschneider, J., Kurent, J., and Ludolph, A. (2013b). Drug therapy for pain in amyotrophic lateral sclerosis or motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005226.
- Briggs, F., and Usrey, W.M. (2009). Modulation of gamma-band activity across local cortical circuits. *Front Integr Neurosci* *3*, 15.
- Brill, M.S., Ninkovic, J., Winpenny, E., Hodge, R.D., Ozen, I., Yang, R., Lepier, A., Gascon, S., Erdelyi, F., Szabo, G., *et al.* (2009). Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci* *12*, 1524-1533.
- Brites, D., and Vaz, A.R. (2014). Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. *Front Cell Neurosci* *8*, 117.
- Brodman, K. (1909). Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues (Barth).
- Brooks, B.R. (1994). El escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* *124*, 96-107.
- Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., and Munsat, T.L. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* *1*, 293-299.
- Brooks, S.P., and Dunnett, S.B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* *10*, 519-529.
- Brown, L.T. (1974). Corticorubral projections in the rat. *J Comp Neurol* *154*, 149-167.
- Brown, R.H., and Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* *377*, 162-172.
- Brujin, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., *et al.* (1997). ALS-Linked SOD1 Mutant G85R Mediates Damage to Astrocytes and Promotes Rapidly Progressive Disease with SOD1-Containing Inclusions. *Neuron* *18*, 327-338.
- Bruneteau, G., Simonet, T., Bauche, S., Mandjee, N., Malfatti, E., Girard, E., Tanguy, M.L., Behin, A., Khiami, F., Sariali, E., *et al.* (2013). Muscle histone deacetylase 4 upregulation in amyotrophic lateral sclerosis: potential role in reinnervation ability and disease progression. *Brain* *136*, 2359-2368.
- Bucy, P.C., Keplinger, J.E., and Siqueira, E.B. (1964). DESTRUCTION OF THE "PYRAMIDAL TRACT" IN MAN. *J Neurosurg* *21*, 285-298.
- Buford, J.A., and Davidson, A.G. (2004). Movement-related and preparatory activity in the reticulospinal system of the monkey. *Exp Brain Res* *159*, 284-300.
- Burbaud, P., Wiart, L., Dubos, J.L., Gaujard, E., Debelleix, X., Joseph, P.A., Mazaux, J.M., Bioulac, B., Barat, M., and Lagueny, A. (1996). A randomised, double blind, placebo controlled trial of botulinum toxin in the treatment of spastic foot in hemiparetic patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *61*, 265-269.

- Burberry, A., Suzuki, N., Wang, J.Y., Moccia, R., Mordes, D.A., Stewart, M.H., Suzuki-Uematsu, S., Ghosh, S., Singh, A., Merkle, F.T., *et al.* (2016). Loss-of-function mutations in the C9ORF72 mouse ortholog cause fatal autoimmune disease. *Sci Transl Med* *8*, 347ra393.
- Burk, K., and Pasterkamp, R.J. (2019). Disrupted neuronal trafficking in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* *137*, 859-877.
- Burke, D. (2016). Clinical uses of H reflexes of upper and lower limb muscles. *Clin Neurophysiol Pract* *1*, 9-17.
- Burrell, J.R., Kiernan, M.C., Vucic, S., and Hodges, J.R. (2011). Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain* *134*, 2582-2594.
- Butti, Z., and Patten, S.A. (2018). RNA Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Genet* *9*, 712.
- Büttner, U., and Büttner-Ennever, J.A. (2006). Present concepts of oculomotor organization. In *Neuroanatomy of the Oculomotor System*, pp. 1-42.
- Butz, M., Wollinsky, K.H., Wiedemuth-Catrinescu, U., Sperfeld, A., Winter, S., Mehrkens, H.H., Ludolph, A.C., and Schreiber, H. (2003). Longitudinal effects of noninvasive positive-pressure ventilation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Phys Med Rehabil* *82*, 597-604.
- Cafferty, W.B., and Strittmatter, S.M. (2006). The Nogo-Nogo receptor pathway limits a spectrum of adult CNS axonal growth. *J Neurosci* *26*, 12242-12250.
- Caioli, S., Curcio, L., Pieri, M., Antonini, A., Marolda, R., Severini, C., and Zona, C. (2011). Substance P receptor activation induces downregulation of the AMPA receptor functionality in cortical neurons from a genetic model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiol Dis* *44*, 92-101.
- Capitano, D., Vasso, M., Ratti, A., Grignaschi, G., Volta, M., Moriggi, M., Daleno, C., Bendotti, C., Silani, V., and Gelfi, C. (2012). Molecular signatures of amyotrophic lateral sclerosis disease progression in hind and forelimb muscles of an SOD1(G93A) mouse model. *Antioxid Redox Signal* *17*, 1333-1350.
- Caragounis, A., Price, K.A., Soon, C.P., Filiz, G., Masters, C.L., Li, Q.X., Crouch, P.J., and White, A.R. (2010). Zinc induces depletion and aggregation of endogenous TDP-43. *Free Radic Biol Med* *48*, 1152-1161.
- Carlson, C.G., Rutter, J., Bledsoe, C., Singh, R., Hoff, H., Bruemmer, K., Sesti, J., Gatti, F., Berge, J., and McCarthy, L. (2010). A simple protocol for assessing inter-trial and inter-examiner reliability for two noninvasive measures of limb muscle strength. *J Neurosci Methods* *186*, 226-230.
- Carvalho, M., Schwartz, M.S., and Swash, M. (1995). Involvement of the external anal sphincter in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* *18*, 848-853.
- Carvalho, M.D., and Swash, M. (2009). Awaji diagnostic algorithm increases sensitivity of El Escorial criteria for ALS diagnosis. *Amyotroph Lateral Scler* *10*, 53-57.
- Catela, C., Shin, M.M., and Dasen, J.S. (2015). Assembly and function of spinal circuits for motor control. *Annu Rev Cell Dev Biol* *31*, 669-698.
- Cedarbaum, J.M., and Stambler, N. (1997). Performance of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFERS) in multicenter clinical trials. *Journal of the Neurological Sciences* *152*, s1-s9.
- Cedarbaum, J.M., Stambler, N., Malta, E., Fuller, C., Hilt, D., Thurmond, B., and Nakanishi, A. (1999). The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *Journal of the Neurological Sciences* *169*, 13-21.
- Celeste, D.B., and Miller, M.S. (2018). Reviewing the evidence for viruses as environmental risk factors for ALS: A new perspective. *Cytokine* *108*, 173-178.

- Chang, Q., and Martin, L.J. (2009). Glycinergic innervation of motoneurons is deficient in amyotrophic lateral sclerosis mice: a quantitative confocal analysis. *Am J Pathol* *174*, 574-585.
- Chang, Q., and Martin, L.J. (2011). Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* *31*, 2815-2827.
- Charcot, J.-M. (1869). Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux anterolateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Norm Pathol* *2*, 354,629,744.
- Chen, B., Schaevitz, L.R., and McConnell, S.K. (2005). Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 17184-17189.
- Chen, B., Wang, S.S., Hattox, A.M., Rayburn, H., Nelson, S.B., and McConnell, S.K. (2008). The Fezf2-Ctip2 genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 11382-11387.
- Chen, H., Qian, K., Du, Z., Cao, J., Petersen, A., Liu, H., Blackbourn, L.W.t., Huang, C.L., Errigo, A., Yin, Y., *et al.* (2014). Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell* *14*, 796-809.
- Chen, H.J., Anagnostou, G., Chai, A., Withers, J., Morris, A., Adhikaree, J., Pennetta, G., and de Bellerocche, J.S. (2010). Characterization of the properties of a novel mutation in VAPB in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* *285*, 40266-40281.
- Chen, X.J., Levedakou, E.N., Millen, K.J., Wollmann, R.L., Soliven, B., and Popko, B. (2007). Proprioceptive sensory neuropathy in mice with a mutation in the cytoplasmic Dynein heavy chain 1 gene. *J Neurosci* *27*, 14515-14524.
- Chew, J., Gendron, T.F., Prudencio, M., Sasaguri, H., Zhang, Y.J., Castanedes-Casey, M., Lee, C.W., Jansen-West, K., Kurti, A., Murray, M.E., *et al.* (2015). Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science* *348*, 1151-1154.
- Chia, R., Chiò, A., and Traynor, B.J. (2018). Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *The Lancet Neurology* *17*, 94-102.
- Chio, A., Bottacchi, E., Buffa, C., Mutani, R., Mora, G., and Parals (2006). Positive effects of tertiary centres for amyotrophic lateral sclerosis on outcome and use of hospital facilities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *77*, 948-950.
- Chio, A., Calvo, A., Moglia, C., Mazzini, L., Mora, G., and group, P.s. (2011). Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *82*, 740-746.
- Chio, A., Logroscino, G., Traynor, B.J., Collins, J., Simeone, J.C., Goldstein, L.A., and White, L.A. (2013). Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology* *41*, 118-130.
- Chiò, A., Pagani, M., Agosta, F., Calvo, A., Cistaro, A., and Filippi, M. (2014). Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. *The Lancet Neurology* *13*, 1228-1240.
- Chou, S.M., and Norris, F.H. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis: lower motor neuron disease spreading to upper motor neurons. *Muscle Nerve* *16*, 864-869.



- Ciura, S., Lattante, S., Le Ber, I., Latouche, M., Tostivint, H., Brice, A., and Kabashi, E. (2013). Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* *74*, 180-187.
- Clare, A.J., Day, R.C., Empson, R.M., and Hughes, S.M. (2018). Transcriptome Profiling of Layer 5 Intratelencephalic Projection Neurons From the Mature Mouse Motor Cortex. *Front Mol Neurosci* *11*, 410.
- Clare, A.J., Wicky, H.E., Empson, R.M., and Hughes, S.M. (2017). RNA-Sequencing Analysis Reveals a Regulatory Role for Transcription Factor Fezf2 in the Mature Motor Cortex. *Front Mol Neurosci* *10*, 283.
- Clark, M.G., Smallwood Shoukry, R., Huang, C.J., Danielian, L.E., Bageac, D., and Floeter, M.K. (2018). Loss of functional connectivity is an early imaging marker in primary lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* *19*, 562-569.
- Clark, R.M., Blizzard, C.A., Young, K.M., King, A.E., and Dickson, T.C. (2017). Calretinin and Neuropeptide Y interneurons are differentially altered in the motor cortex of the SOD1(G93A) mouse model of ALS. *Sci Rep* *7*, 44461.
- Clowry, G.J., Davies, B.M., Upile, N.S., Gibson, C.L., and Bradley, P.M. (2004). Spinal cord plasticity in response to unilateral inhibition of the rat motor cortex during development: changes to gene expression, muscle afferents and the ipsilateral corticospinal projection. *Eur J Neurosci* *20*, 2555-2566.
- Commisso, B., Ding, L., Varadi, K., Gorges, M., Bayer, D., Boeckers, T.M., Ludolph, A.C., Kassubek, J., Muller, O.J., and Roselli, F. (2018). Stage-dependent remodeling of projections to motor cortex in ALS mouse model revealed by a new variant retrograde-AAV9. *Elife* *7*.
- Cooke, D.F., and Graziano, M.S. (2004). Sensorimotor integration in the precentral gyrus: polysensory neurons and defensive movements. *J Neurophysiol* *91*, 1648-1660.
- Corcia, P., Tauber, C., Vercoullie, J., Arlicot, N., Prunier, C., Praline, J., Nicolas, G., Venel, Y., Hommet, C., Baulieu, J.L., *et al.* (2012). Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* *7*, e52941.
- Corrado, L., Carlomagno, Y., Falasco, L., Mellone, S., Godi, M., Cova, E., Cereda, C., Testa, L., Mazzini, L., and D'Alfonso, S. (2011). A novel peripherin gene (PRPH) mutation identified in one sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient. *Neurobiol Aging* *32*, 552 e551-556.
- Couratier, P., Corcia, P., Lautrette, G., Nicol, M., Preux, P.M., and Marin, B. (2016). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Rev Neurol (Paris)* *172*, 37-45.
- Courtine, G., Bunge, M.B., Fawcett, J.W., Grossman, R.G., Kaas, J.H., Lemon, R., Maier, I., Martin, J., Nudo, R.J., Ramon-Cueto, A., *et al.* (2007). Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? *Nat Med* *13*, 561-566.
- Courtine, G., Roy, R.R., Raven, J., Hodgson, J., McKay, H., Yang, H., Zhong, H., Tuszynski, M.H., and Edgerton, V.R. (2005). Performance of locomotion and foot grasping following a unilateral thoracic corticospinal tract lesion in monkeys (*Macaca mulatta*). *Brain* *128*, 2338-2358.
- Courtine, G., Song, B., Roy, R.R., Zhong, H., Herrmann, J.E., Ao, Y., Qi, J., Edgerton, V.R., and Sofroniew, M.V. (2008). Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med* *14*, 69-74.
- Cousse, E., De Smet, P., Bogaert, E., Elens, I., Van Damme, P., Willems, P., Koopman, W., Van Den Bosch, L., and Callewaert, G. (2011). G37R SOD1 mutant alters mitochondrial complex I activity, Ca(2+) uptake and ATP production. *Cell Calcium* *49*, 217-225.

- Cowie, R.J., and Robinson, D.L. (1994). Subcortical contributions to head movements in macaques. I. Contrasting effects of electrical stimulation of a medial pontomedullary region and the superior colliculus. *J Neurophysiol* 72, 2648-2664.
- Crone, C., Johnsen, L.L., Biering-Sorensen, F., and Nielsen, J.B. (2003). Appearance of reciprocal facilitation of ankle extensors from ankle flexors in patients with stroke or spinal cord injury. *Brain* 126, 495-507.
- Crone, C., Nielsen, J., Petersen, N., Ballegaard, M., and Hultborn, H. (1994). Disynaptic reciprocal inhibition of ankle extensors in spastic patients. *Brain* 117 ( Pt 5), 1161-1168.
- Cronin, S., Hardiman, O., and Traynor, B.J. (2007). Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* 68, 1002-1007.
- Crugnola, V., Lamperti, C., Lucchini, V., Ronchi, D., Peverelli, L., Prella, A., Sciacco, M., Bordoni, A., Fassone, E., Fortunato, F., *et al.* (2010). Mitochondrial respiratory chain dysfunction in muscle from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 67, 849-854.
- Cykowski, M.D., Takei, H., Schulz, P.E., Appel, S.H., and Powell, S.Z. (2014). TDP-43 pathology in the basal forebrain and hypothalamus of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* 2, 171.
- D'Amico, A., Mercuri, E., Tiziano, F.D., and Bertini, E. (2011). Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis* 6, 71.
- D'Amico, J.M., Condliffe, E.G., Martins, K.J., Bennett, D.J., and Gorassini, M.A. (2014). Recovery of neuronal and network excitability after spinal cord injury and implications for spasticity. *Front Integr Neurosci* 8, 36.
- Da Cruz, S., Parone, P.A., Lopes, V.S., Lillo, C., McAlonis-Downes, M., Lee, S.K., Vetto, A.P., Petrosyan, S., Marsala, M., Murphy, A.N., *et al.* (2012). Elevated PGC-1alpha activity sustains mitochondrial biogenesis and muscle function without extending survival in a mouse model of inherited ALS. *Cell Metab* 15, 778-786.
- Dadon-Nachum, M., Melamed, E., and Offen, D. (2011). The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci* 43, 470-477.
- Dajas-Bailador, F., Bonev, B., Garcez, P., Stanley, P., Guillemot, F., and Papalopulu, N. (2012). microRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nat Neurosci* 15, 697-699.
- Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1995). Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Research* 676, 25-40.
- Dalla Bella, E., Lombardi, R., Porretta-Serapiglia, C., Ciano, C., Gellera, C., Pensato, V., Cazzato, D., and Lauria, G. (2016). Amyotrophic lateral sclerosis causes small fiber pathology. *Eur J Neurol* 23, 416-420.
- Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M., and Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca<sup>2+</sup> capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem* 96, 1349-1361.
- Dasen, J.S. (2009). Chapter 4 Transcriptional Networks in the Early Development of Sensory–Motor Circuits. In *Development of Neural Circuitry*, pp. 119-148.
- Daube, J.R. (2000). Electrodiagnostic studies in amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders. *Muscle Nerve* 23, 1488-1502.

- Davare, M., Zenon, A., Desmurget, M., and Olivier, E. (2015). Dissociable contribution of the parietal and frontal cortex to coding movement direction and amplitude. *Front Hum Neurosci* 9, 241.
- Davidoff, R.A. (1990). The pyramidal tract. *Neurology* 40, 332-339.
- Davidson, A.G., Schieber, M.H., and Buford, J.A. (2007). Bilateral spike-triggered average effects in arm and shoulder muscles from the monkey pontomedullary reticular formation. *J Neurosci* 27, 8053-8058.
- de Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J.D., Kaji, R., Kimura, J., Mills, K., Mitsumoto, H., Nodera, H., Shefner, J., *et al.* (2008). Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol* 119, 497-503.
- de Carvalho, M., Eisen, A., Krieger, C., and Swash, M. (2014). Motoneuron firing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Front Hum Neurosci* 8, 719.
- de Carvalho, M., Matias, T., Coelho, F., Evangelista, T., Pinto, A., and Luís, M.L.S. (1996). Motor neuron disease presenting with respiratory failure. *Journal of the Neurological Sciences* 139, 117-122.
- de Carvalho, M., and Swash, M. (2000). Nerve conduction studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 23, 344-352.
- De Giorgio, F., Maduro, C., Fisher, E.M.C., and Acevedo-Arozena, A. (2019). Transgenic and physiological mouse models give insights into different aspects of amyotrophic lateral sclerosis. *Dis Model Mech* 12.
- de Noordhout, A.M., Rapisarda, G., Bogacz, D., Gerard, P., De Pasqua, V., Pennisi, G., and Delwaide, P.J. (1999). Corticomotoneuronal synaptic connections in normal man: an electrophysiological study. *Brain* 122 ( Pt 7), 1327-1340.
- de Oliveira-Souza, R. (2012). The human extrapyramidal system. *Med Hypotheses* 79, 843-852.
- de Oliveira, G.P., Maximino, J.R., Maschietto, M., Zanoteli, E., Puga, R.D., Lima, L., Carraro, D.M., and Chadi, G. (2014). Early gene expression changes in skeletal muscle from SOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis animal model. *Cell Mol Neurobiol* 34, 451-462.
- De Vos, K.J., Chapman, A.L., Tennant, M.E., Manser, C., Tudor, E.L., Lau, K.F., Brownlees, J., Ackerley, S., Shaw, P.J., McLoughlin, D.M., *et al.* (2007). Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet* 16, 2720-2728.
- Dedic, S.I., Stevic, Z., Dedic, V., Stojanovic, V.R., Milicev, M., and Lavrnic, D. (2012). Is hyperlipidemia correlated with longer survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis? *Neurol Res* 34, 576-580.
- Deenen, J.C., Horlings, C.G., Verschuuren, J.J., Verbeek, A.L., and van Engelen, B.G. (2015). The Epidemiology of Neuromuscular Disorders: A Comprehensive Overview of the Literature. *J Neuromuscul Dis* 2, 73-85.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., *et al.* (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245-256.
- del Aguila, M.A., Longstreth, W.T., Jr., McGuire, V., Koepsell, T.D., and van Belle, G. (2003). Prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Neurology* 60, 813-819.
- 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., Gao, K., and Jankovic, J. (2014). The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol* 10, 337-348.
- Deng, H.X., Chen, W., Hong, S.T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., *et al.* (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477, 211-215.
- Dentel, C., Palamiuc, L., Henriques, A., Lannes, B., Spreux-Varoquaux, O., Gutknecht, L., Rene, F., Echaniz-Laguna, A., Gonzalez de Aguilar, J.L., Lesch, K.P., *et al.* (2013). Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* 136, 483-493.
- Dervishi, I., and Ozdinler, P.H. (2018). Incorporating upper motor neuron health in ALS drug discovery. *Drug Discov Today* 23, 696-703.
- Desmedt, J.E. (1983). Size principle of motoneuron recruitment and the calibration of muscle force and speed in man. *Adv Neurol* 39, 227-251.
- Desport, J.C., Preux, P.M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J.M., Beaufriere, B., and Couratier, P. (2001). Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr* 74, 328-334.
- Desport, J.C., Preux, P.M., Truong, T.C., Vallat, J.M., Sautereau, D., and Couratier, P. (1999). Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. *Neurology* 53, 1059-1063.
- Deumens, R., Koopmans, G.C., and Joosten, E.A. (2005). Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Prog Neurobiol* 77, 57-89.
- Devoy, A., Kalmar, B., Stewart, M., Park, H., Burke, B., Noy, S.J., Redhead, Y., Humphrey, J., Lo, K., Jaeger, J., *et al.* (2017). Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in 'FUSDelta14' knockin mice. *Brain* 140, 2797-2805.
- Dini Modigliani, S., Morlando, M., Errichelli, L., Sabatelli, M., and Bozzoni, I. (2014). An ALS-associated mutation in the FUS 3'-UTR disrupts a microRNA-FUS regulatory circuitry. *Nat Commun* 5, 4335.
- Do-Ha, D., Buskila, Y., and Ooi, L. (2018). Impairments in Motor Neurons, Interneurons and Astrocytes Contribute to Hyperexcitability in ALS: Underlying Mechanisms and Paths to Therapy. *Mol Neurobiol* 55, 1410-1418.
- Dobrowolny, G., Aucello, M., and Musaro, A. (2011). Muscle atrophy induced by SOD1G93A expression does not involve the activation of caspase in the absence of denervation. *Skelet Muscle* 1, 3.
- Donnelly, C.J., Zhang, P.W., Pham, J.T., Haeusler, A.R., Mistry, N.A., Vidensky, S., Daley, E.L., Poth, E.M., Hoover, B., Fines, D.M., *et al.* (2013). RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron* 80, 415-428.
- Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., Than, M.E., Mackenzie, I.R., Capell, A., Schmid, B., *et al.* (2010). ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J* 29, 2841-2857.
- Dorst, J., Cypionka, J., and Ludolph, A.C. (2013). High-caloric food supplements in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: a prospective interventional study. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14, 533-536.
- Dorst, J., Dupuis, L., Petri, S., Kollwe, K., Abdulla, S., Wolf, J., Weber, M., Czell, D., Burkhardt, C., Hanisch, F., *et al.* (2015). Percutaneous endoscopic gastrostomy in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective observational study. *J Neurol* 262, 849-858.

- Dorst, J., Ludolph, A.C., and Huebers, A. (2018). Disease-modifying and symptomatic treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* *11*, 1756285617734734.
- Douville, R., Liu, J., Rothstein, J., and Nath, A. (2011). Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* *69*, 141-151.
- Dubowitz, V. (1999). Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *Eur J Paediatr Neurol* *3*, 49-51.
- Duch, C., Vonhoff, F., and Ryglewski, S. (2008). Dendrite elongation and dendritic branching are affected separately by different forms of intrinsic motoneuron excitability. *J Neurophysiol* *100*, 2525-2536.
- Duchateau, J., and Enoka, R.M. (2011). Human motor unit recordings: origins and insight into the integrated motor system. *Brain Res* *1409*, 42-61.
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J.L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., Seilhean, D., Hauw, J.J., Lacomblez, L., Loeffler, J.P., *et al.* (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* *70*, 1004-1009.
- Dupuis, L., de Tapia, M., Rene, F., Lutz-Bucher, B., Gordon, J.W., Mercken, L., Pradier, L., and Loeffler, J.P. (2000). Differential screening of mutated SOD1 transgenic mice reveals early up-regulation of a fast axonal transport component in spinal cord motor neurons. *Neurobiol Dis* *7*, 274-285.
- Dupuis, L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Oudart, H., Pradat, P.F., Meininger, V., and Loeffler, J.P. (2003). Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J* *17*, 2091-2093.
- Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.L., and Loeffler, J.P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11159-11164.
- Dupuis, L., Pradat, P.F., Ludolph, A.C., and Loeffler, J.P. (2011). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* *10*, 75-82.
- Dupuis, L., Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Jullien, P., Lacomblez, L., Salachas, F., Bruneteau, G., Pradat, P.F., Loeffler, J.P., and Meininger, V. (2010). Platelet serotonin level predicts survival in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* *5*, e13346.
- Eckler, M.J., and Chen, B. (2014). Fez family transcription factors: controlling neurogenesis and cell fate in the developing mammalian nervous system. *Bioessays* *36*, 788-797.
- Eckler, M.J., Larkin, K.A., McKenna, W.L., Katzman, S., Guo, C., Roque, R., Visel, A., Rubenstein, J.L., and Chen, B. (2014). Multiple conserved regulatory domains promote Fezf2 expression in the developing cerebral cortex. *Neural Dev* *9*, 6.
- Edbauer, D., Neilson, J.R., Foster, K.A., Wang, C.F., Seeburg, D.P., Batterton, M.N., Tada, T., Dolan, B.M., Sharp, P.A., and Sheng, M. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* *65*, 373-384.
- Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., *et al.* (2012). Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* *4*, 145ra104.
- Eisen, A., Braak, H., Del Tredici, K., Lemon, R., Ludolph, A.C., and Kiernan, M.C. (2017). Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *88*, 917-924.

- Eisen, A., Kiernan, M., Mitsumoto, H., and Swash, M. (2014). Amyotrophic lateral sclerosis: a long preclinical period? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *85*, 1232-1238.
- Eisen, A., Kim, S., and Pant, B. (1992). Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve* *15*, 219-224.
- Eisen, A., Schulzer, M., MacNeil, M., Pant, B., and Mak, E. (1993). Duration of amyotrophic lateral sclerosis is age dependent. *Muscle Nerve* *16*, 27-32.
- Eisen, A., and Weber, M. (2000). Neurophysiological evaluation of cortical function in the early diagnosis of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* *1 Suppl 1*, S47-51.
- Eisen, A., and Weber, M. (2001). The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* *24*, 564-573.
- Eitan, C., and Hornstein, E. (2016). Vulnerability of microRNA biogenesis in FTD-ALS. *Brain Res* *1647*, 105-111.
- El Oussini, H., Bayer, H., Scekcic-Zahirovic, J., Vercruyssen, P., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., Dieterle, S., Echaniz-Laguna, A., Larmet, Y., Muller, K., *et al.* (2016). Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* *131*, 465-480.
- El Oussini, H., Scekcic-Zahirovic, J., Vercruyssen, P., Marques, C., Dirrig-Grosch, S., Dieterle, S., Picchiarelli, G., Sinniger, J., Rouaux, C., and Dupuis, L. (2017). Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* *82*, 444-456.
- Elamin, M., Bede, P., Montuschi, A., Pender, N., Chio, A., and Hardiman, O. (2015). Predicting prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a simple algorithm. *J Neurol* *262*, 1447-1454.
- Elbasiouny, S.M., Amendola, J., Durand, J., and Heckman, C.J. (2010). Evidence from computer simulations for alterations in the membrane biophysical properties and dendritic processing of synaptic inputs in mutant superoxide dismutase-1 motoneurons. *J Neurosci* *30*, 5544-5558.
- Elovic, E.P., Esquenazi, A., Alter, K.E., Lin, J.L., Alfaro, A., and Kaelin, D.L. (2009). Chemodenervation and nerve blocks in the diagnosis and management of spasticity and muscle overactivity. *PM R* *1*, 842-851.
- Endo, F., Komine, O., Fujimori-Tonou, N., Katsuno, M., Jin, S., Watanabe, S., Sobue, G., Dezawa, M., Wyss-Coray, T., and Yamanaka, K. (2015). Astrocyte-derived TGF-beta1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells. *Cell Rep* *11*, 592-604.
- Engelhardt, J.I., Tajti, J., and Appel, S.H. (1993). Lymphocytic Infiltrates in the Spinal Cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Archives of Neurology* *50*, 30-36.
- Faist, M., Mazevet, D., Dietz, V., and Pierrot-Deseilligny, E. (1994). A quantitative assessment of presynaptic inhibition of Ia afferents in spastics. Differences in hemiplegics and paraplegics. *Brain* *117 ( Pt 6)*, 1449-1455.
- Falkner, S., Grade, S., Dimou, L., Conzelmann, K.K., Bonhoeffer, T., Gotz, M., and Hubener, M. (2016). Transplanted embryonic neurons integrate into adult neocortical circuits. *Nature* *539*, 248-253.
- Fang, F., Bellocchio, R., Hernan, M.A., and Ye, W. (2006). Smoking, snuff dipping and the risk of amyotrophic lateral sclerosis--a prospective cohort study. *Neuroepidemiology* *27*, 217-221.
- Farg, M.A., Soo, K.Y., Walker, A.K., Pham, H., Orian, J., Horne, M.K., Warraich, S.T., Williams, K.L., Blair, I.P., and Atkin, J.D. (2012). Mutant FUS induces endoplasmic reticulum stress in amyotrophic lateral sclerosis and interacts with protein disulfide-isomerase. *Neurobiol Aging* *33*, 2855-2868.

- Farg, M.A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J.M., Yang, S., Atkinson, R.A., Levina, V., Halloran, M.A., Gleeson, P.A., Blair, I.P., Soo, K.Y., *et al.* (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet* 23, 3579-3595.
- Fecto, F., Yan, J., Vemula, S.P., Liu, E., Yang, Y., Chen, W., Zheng, J.G., Shi, Y., Siddique, N., Arrat, H., *et al.* (2011). SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 68, 1440-1446.
- Feiler, M.S., Strobel, B., Freischmidt, A., Helferich, A.M., Kappel, J., Brewer, B.M., Li, D., Thal, D.R., Walther, P., Ludolph, A.C., *et al.* (2015). TDP-43 is intercellularly transmitted across axon terminals. *J Cell Biol* 211, 897-911.
- Fekete, T., Zach, N., Mujica-Parodi, L.R., and Turner, M.R. (2013). Multiple kernel learning captures a systems-level functional connectivity biomarker signature in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 8, e85190.
- Feldman, E.L., Boulis, N.M., Hur, J., Johe, K., Rutkove, S.B., Federici, T., Polak, M., Bordeau, J., Sakowski, S.A., and Glass, J.D. (2014). Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: phase 1 trial outcomes. *Ann Neurol* 75, 363-373.
- Felice, K.J. (1997). A longitudinal study comparing thenar motor unit number estimates to other quantitative tests in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 20, 179-185.
- Ferraiuolo, L., Higginbottom, A., Heath, P.R., Barber, S., Greenald, D., Kirby, J., and Shaw, P.J. (2011a). Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134, 2627-2641.
- Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A.J., Sendtner, M., and Shaw, P.J. (2011b). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 7, 616-630.
- Ferraiuolo, L., Meyer, K., Sherwood, T.W., Vick, J., Likhite, S., Frakes, A., Miranda, C.J., Braun, L., Heath, P.R., Pineda, R., *et al.* (2016). Oligodendrocytes contribute to motor neuron death in ALS via SOD1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E6496-E6505.
- Fields, R.D., and Stevens-Graham, B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science* 298, 556-562.
- Fil, D., DeLoach, A., Yadav, S., Alkam, D., MacNicol, M., Singh, A., Compadre, C.M., Goellner, J.J., O'Brien, C.A., Fahmi, T., *et al.* (2017). Mutant Profilin1 transgenic mice recapitulate cardinal features of motor neuron disease. *Hum Mol Genet* 26, 686-701.
- Filippini, N., Douaud, G., Mackay, C.E., Knight, S., Talbot, K., and Turner, M.R. (2010). Corpus callosum involvement is a consistent feature of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 75, 1645-1652.
- Fink, J.K. (2013). Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol* 126, 307-328.
- Finkel, R.S., Mercuri, E., Darras, B.T., Connolly, A.M., Kuntz, N.L., Kirschner, J., Chiriboga, C.A., Saito, K., Servais, L., Tizzano, E., *et al.* (2017). Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 377, 1723-1732.
- Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., and Glass, J.D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental Neurology* 185, 232-240.
- Fischer, L.R., Li, Y., Asress, S.A., Jones, D.P., and Glass, J.D. (2012). Absence of SOD1 leads to oxidative stress in peripheral nerve and causes a progressive distal motor axonopathy. *Exp Neurol* 233, 163-171.

- Fitzgerald, K.C., O'Reilly, E.J., Falcone, G.J., McCullough, M.L., Park, Y., Kolonel, L.N., and Ascherio, A. (2014). Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and risk for amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol* *71*, 1102-1110.
- Flood, D.G., Reaume, A.G., Gruner, J.A., Hoffman, E.K., Hirsch, J.D., Lin, Y.-G., Dorfman, K.S., and Scott, R.W. (1999). Hindlimb Motor Neurons Require Cu/Zn Superoxide Dismutase for Maintenance of Neuromuscular Junctions. *The American Journal of Pathology* *155*, 663-672.
- Flucher, B.E., and Daniels, M.P. (1989). Distribution of Na<sup>+</sup> channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron* *3*, 163-175.
- Flumerfelt, B.A. (1980). An ultrastructural investigation of afferent connections of the red nucleus in the rat. *J Anat* *131*, 621-633.
- Foerster, B.R., Callaghan, B.C., Petrou, M., Edden, R.A., Chenevert, T.L., and Feldman, E.L. (2012). Decreased motor cortex gamma-aminobutyric acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* *78*, 1596-1600.
- Foerster, B.R., Carlos, R.C., Dwamena, B.A., Callaghan, B.C., Petrou, M., Edden, R.A., Mohamed, M.A., Welsh, R.C., Barker, P.B., Feldman, E.L., *et al.* (2014). Multimodal MRI as a diagnostic biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* *1*, 107-114.
- Fogarty, M.J., Klenowski, P.M., Lee, J.D., Drieberg-Thompson, J.R., Bartlett, S.E., Ngo, S.T., Hilliard, M.A., Bellingham, M.C., and Noakes, P.G. (2016a). Cortical synaptic and dendritic spine abnormalities in a presymptomatic TDP-43 model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* *6*, 37968.
- Fogarty, M.J., Mu, E.W., Noakes, P.G., Lavidis, N.A., and Bellingham, M.C. (2016b). Marked changes in dendritic structure and spine density precede significant neuronal death in vulnerable cortical pyramidal neuron populations in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* *4*, 77.
- Fogarty, M.J., Noakes, P.G., and Bellingham, M.C. (2015). Motor cortex layer V pyramidal neurons exhibit dendritic regression, spine loss, and increased synaptic excitation in the presymptomatic hSOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* *35*, 643-647.
- Foran, E., Bogush, A., Goffredo, M., Roncaglia, P., Gustincich, S., Pasinelli, P., and Trotti, D. (2011). Motor neuron impairment mediated by a sumoylated fragment of the glial glutamate transporter EAAT2. *Glia* *59*, 1719-1731.
- Foran, E., and Trotti, D. (2009). Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* *11*, 1587-1602.
- Forbes, R.B., Colville, S., Cran, G.W., Swingler, R.J., and Scottish Motor Neurone Disease, R. (2004). Unexpected decline in survival from amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *75*, 1753-1755.
- Formica, A., Verger, K., Sol, J.M., and Morralla, C. (2005). [Gabapentin for spasticity: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial]. *Med Clin (Barc)* *124*, 81-85.
- Freibaum, B.D., Chitta, R.K., High, A.A., and Taylor, J.P. (2010). Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *J Proteome Res* *9*, 1104-1120.
- French, J.D. (1957). THE RETICULAR FORMATION. *Scientific American* *196*, 54-61.



- 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. *The Journal of Neuroscience* 20, 2534-2542.
- Fuchs, A., Ringer, C., Bilkei-Gorzo, A., Weihe, E., Roeper, J., and Schutz, B. (2010). Downregulation of the potassium chloride cotransporter KCC2 in vulnerable motoneurons in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 1057-1070.
- Fujimori, K., Ishikawa, M., Otomo, A., Atsuta, N., Nakamura, R., Akiyama, T., Hadano, S., Aoki, M., Saya, H., Sobue, G., *et al.* (2018). Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat Med* 24, 1579-1589.
- Fulton, J.F. (1935). A Note on the Definition of the "Motor" and "Premotor" Areas. *Brain* 58, 311-316.
- Fumagalli, E., Funicello, M., Rauen, T., Gobbi, M., and Mennini, T. (2008). Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *Eur J Pharmacol* 578, 171-176.
- Funalot, B., Desport, J.C., Sturtz, F., Camu, W., and Couratier, P. (2009). High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 10, 113-117.
- Funikov, S.Y., Rezykh, A.P., Mazin, P.V., Morozov, A.V., Maltsev, A.V., Chicheva, M.M., Vikhareva, E.A., Evgen'ev, M.B., and Ustyugov, A.A. (2018). FUS(1-359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy. *Neurogenetics* 19, 189-204.
- Galbiati, M., Onesto, E., Zito, A., Crippa, V., Rusmini, P., Mariotti, R., Bentivoglio, M., Bendotti, C., and Poletti, A. (2012). The anabolic/androgenic steroid nandrolone exacerbates gene expression modifications induced by mutant SOD1 in muscles of mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacol Res* 65, 221-230.
- Gandelman, M., Peluffo, H., Beckman, J.S., Cassina, P., and Barbeito, L. (2010). Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 7, 33.
- Ganel, R., Ho, T., Maragakis, N.J., Jackson, M., Steiner, J.P., and Rothstein, J.D. (2006). Selective up-regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporter GLT1 by a neuroimmunophilin ligand results in neuroprotection. *Neurobiol Dis* 21, 556-567.
- Ganesalingam, J., An, J., Bowser, R., Andersen, P.M., and Shaw, C.E. (2013). pNfH is a promising biomarker for ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14, 146-149.
- Ganesalingam, J., An, J., Shaw, C.E., Shaw, G., Lacomis, D., and Bowser, R. (2011). Combination of neurofilament heavy chain and complement C3 as CSF biomarkers for ALS. *J Neurochem* 117, 528-537.
- Ganzini, L., Johnston, W.S., and Hoffman, W.F. (1999). Correlates of suffering in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 52, 1434-1440.
- Garcia-Cabezas, M.A., and Barbas, H. (2014). Area 4 has layer IV in adult primates. *Eur J Neurosci* 39, 1824-1834.
- Garcia Santos, J.M., Inuggi, A., Gomez Espuch, J., Vazquez, C., Iniesta, F., Blanquer, M., Maria Moraleda, J., and Martinez, S. (2016). Spinal cord infusion of stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: Magnetic resonance spectroscopy shows metabolite improvement in the precentral gyrus. *Cytotherapy* 18, 785-796.
- Gatto, R.G., Amin, M., Finkielstein, A., Weissmann, C., Barrett, T., Lamoutte, C., Uchitel, O., Sumagin, R., Mareci, T.H., and Magin, R.L. (2019). Unveiling early cortical and subcortical neuronal

degeneration in ALS mice by ultra-high field diffusion MRI. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 1-13.

- Gautam, M., Jara, J.H., Kocak, N., Rylaarsdam, L.E., Kim, K.D., Bigio, E.H., and Hande Ozdinler, P. (2019). Mitochondria, ER, and nuclear membrane defects reveal early mechanisms for upper motor neuron vulnerability with respect to TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol* 137, 47-69.
- Gautier, G., Verschuere, A., Monnier, A., Attarian, S., Salort-Campana, E., and Pouget, J. (2010). ALS with respiratory onset: clinical features and effects of non-invasive ventilation on the prognosis. *Amyotroph Lateral Scler* 11, 379-382.
- Geevasinga, N., Menon, P., Ng, K., Van Den Bos, M., Byth, K., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2016a). Riluzole exerts transient modulating effects on cortical and axonal hyperexcitability in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 17, 580-588.
- Geevasinga, N., Menon, P., Ozdinler, P.H., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2016b). Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat Rev Neurol* 12, 651-661.
- Geevasinga, N., Menon, P., Scherman, D.B., Simon, N., Yiannikas, C., Henderson, R.D., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2016c). Diagnostic criteria in amyotrophic lateral sclerosis: A multicenter prospective study. *Neurology* 87, 684-690.
- Gelber, D.A., Good, D.C., Dromerick, A., Sergay, S., and Richardson, M. (2001). Open-label dose-titration safety and efficacy study of tizanidine hydrochloride in the treatment of spasticity associated with chronic stroke. *Stroke* 32, 1841-1846.
- Genc, B., Jara, J.H., Lagrimas, A.K., Pytel, P., Roos, R.P., Mesulam, M.M., Geula, C., Bigio, E.H., and Ozdinler, P.H. (2017). Apical dendrite degeneration, a novel cellular pathology for Betz cells in ALS. *Sci Rep* 7, 41765.
- Gendron, T.F., Bieniek, K.F., Zhang, Y.J., Jansen-West, K., Ash, P.E., Caulfield, T., Daugherty, L., Dunmore, J.H., Castanedes-Casey, M., Chew, J., *et al.* (2013). Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol* 126, 829-844.
- Genin, E.C., Plutino, M., Bannwarth, S., Villa, E., Cisneros-Barroso, E., Roy, M., Ortega-Vila, B., Fragaki, K., Lespinasse, F., Pinero-Martos, E., *et al.* (2016). CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol Med* 8, 58-72.
- Georgopoulos, A.P., Ashe, J., Smyrnis, N., and Taira, M. (1992). The motor cortex and the coding of force. *Science* 256, 1692-1695.
- Georgopoulos, A.P., Schwartz, A.B., and Kettner, R.E. (1986). Neuronal population coding of movement direction. *Science* 233, 1416-1419.
- Gerber, Y.N., Sabourin, J.C., Rabano, M., Vivanco, M., and Perrin, F.E. (2012). Early functional deficit and microglial disturbances in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7, e36000.
- Geser, F., Stein, B., Partain, M., Elman, L.B., McCluskey, L.F., Xie, S.X., Van Deerlin, V.M., Kwong, L.K., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2011). Motor neuron disease clinically limited to the lower motor neuron is a diffuse TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol* 121, 509-517.
- Geyer, S., Ledberg, A., Schleicher, A., Kinomura, S., Schormann, T., Burgel, U., Klingberg, T., Larsson, J., Zilles, K., and Roland, P.E. (1996). Two different areas within the primary motor cortex of man. *Nature* 382, 805-807.

- Gibson, A.R., Houk, J.C., and Kohlerman, N.J. (1985). Magnocellular red nucleus activity during different types of limb movement in the macaque monkey. *J Physiol* 358, 527-549.
- Gill, C., Phelan, J.P., Hatzipetros, T., Kidd, J.D., Tassinari, V.R., Levine, B., Wang, M.Z., Moreno, A., Thompson, K., Maier, M., *et al.* (2019). SOD1-positive aggregate accumulation in the CNS predicts slower disease progression and increased longevity in a mutant SOD1 mouse model of ALS. *Sci Rep* 9, 6724.
- Glass, J.D. (2012). New drugs for ALS: how do we get there? *Exp Neurol* 233, 112-117.
- Glass, J.D., Hertzberg, V.S., Boulis, N.M., Riley, J., Federici, T., Polak, M., Bordeau, J., Fournier, C., Johe, K., Hazel, T., *et al.* (2016). Transplantation of spinal cord-derived neural stem cells for ALS: Analysis of phase 1 and 2 trials. *Neurology* 87, 392-400.
- Goetz, C.G. (2000). Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve* 23, 336-343.
- Gonzalez de Aguilar, J.L., Niederhauser-Wiederkehr, C., Halter, B., De Tapia, M., Di Scala, F., Demougin, P., Dupuis, L., Primig, M., Meininger, V., and Loeffler, J.P. (2008). Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiol Genomics* 32, 207-218.
- Gordon, P.H., Cheng, B., Katz, I.B., Mitsumoto, H., and Rowland, L.P. (2009). Clinical features that distinguish PLS, upper motor neuron-dominant ALS, and typical ALS. *Neurology* 72, 1948-1952.
- Gordon, P.H., Cheng, B., Katz, I.B., Pinto, M., Hays, A.P., Mitsumoto, H., and Rowland, L.P. (2006). The natural history of primary lateral sclerosis. *Neurology* 66, 647-653.
- Gorges, M., Vercruyssen, P., Muller, H.P., Huppertz, H.J., Rosenbohm, A., Nagel, G., Weydt, P., Petersen, A., Ludolph, A.C., Kassubek, J., *et al.* (2017). Hypothalamic atrophy is related to body mass index and age at onset in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 1033-1041.
- Gossard, J.P., Brownstone, R.M., Barajon, I., and Hultborn, H. (1994). Transmission in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat. *Exp Brain Res* 98, 213-228.
- Goulding, M. (2009). Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nat Rev Neurosci* 10, 507-518.
- Goutman, S.A. (2017). Diagnosis and Clinical Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders. *Continuum (Minneapolis)* 23, 1332-1359.
- Grad, L.I., Pokrishevsky, E., and Cashman, N.R. (2017). Intercellular Prion-Like Conversion and Transmission of Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) in Cell Culture. *Methods Mol Biol* 1658, 357-367.
- Graffmo, K.S., Forsberg, K., Bergh, J., Birve, A., Zetterstrom, P., Andersen, P.M., Marklund, S.L., and Brannstrom, T. (2013). Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 22, 51-60.
- Grafton, S.T., Woods, R.P., and Mazziotta, J.C. (1993). Within-arm somatotopy in human motor areas determined by positron emission tomography imaging of cerebral blood flow. *Exp Brain Res* 95, 172-176.
- Graziano, M. (2006). The organization of behavioral repertoire in motor cortex. *Annu Rev Neurosci* 29, 105-134.
- Graziano, M.S., Aflalo, T.N., and Cooke, D.F. (2005). Arm movements evoked by electrical stimulation in the motor cortex of monkeys. *J Neurophysiol* 94, 4209-4223.
- Graziano, M.S., Cooke, D.F., Taylor, C.S., and Moore, T. (2004). Distribution of hand location in monkeys during spontaneous behavior. *Exp Brain Res* 155, 30-36.

- Gresham, L.S., Molgaard, C.A., Golbeck, A.L., and Smith, R. (1986). Amyotrophic lateral sclerosis and occupational heavy metal exposure: a case-control study. *Neuroepidemiology* 5, 29-38.
- Gros-Louis, F., Lariviere, R., Gowing, G., Laurent, S., Camu, W., Bouchard, J.P., Meininger, V., Rouleau, G.A., and Julien, J.P. (2004). A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 279, 45951-45956.
- Group, P.S. (2015). Gastrostomy in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ProGas): a prospective cohort study. *The Lancet Neurology* 14, 702-709.
- Grunbaum, A.S.F.S.C.S. (1902). Observations on the physiology of the cerebral cortex of some of the higher apes. (Preliminary communication.). *Proceedings of the Royal Society of London* 69, 206-209.
- Gu, Z., Kalambogias, J., Yoshioka, S., Han, W., Li, Z., Kawasaki, Y.I., Pochareddy, S., Li, Z., Liu, F., Xu, X., *et al.* (2017). Control of species-dependent cortico-motoneuronal connections underlying manual dexterity. *Science* 357, 400-404.
- Guigon, E., Baraduc, P., and Desmurget, M. (2007). Coding of movement- and force-related information in primate primary motor cortex: a computational approach. *Eur J Neurosci* 26, 250-260.
- Guo, X., Gonzalez, M., Stancescu, M., Vandeburgh, H.H., and Hickman, J.J. (2011). Neuromuscular junction formation between human stem cell-derived motoneurons and human skeletal muscle in a defined system. *Biomaterials* 32, 9602-9611.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., *et al.* (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.
- Halsband, U., Ito, N., Tanji, J., and Freund, H.J. (1993). The role of premotor cortex and the supplementary motor area in the temporal control of movement in man. *Brain* 116 ( Pt 1), 243-266.
- Halter, B., Gonzalez de Aguilar, J.L., Rene, F., Petri, S., Fricker, B., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Larmet, Y., and Loeffler, J.P. (2010). Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 48, 915-923.
- Hammer, R.P., Tomiyasu, U., and Scheibel, A.B. (1979). Degeneration of the human Betz cell due to amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology* 63, 336-346.
- Han, J., and Ma, L. (2010). Study of the features of proton MR spectroscopy ((1)H-MRS) on amyotrophic lateral sclerosis. *J Magn Reson Imaging* 31, 305-308.
- Han, Q., Cao, C., Ding, Y., So, K.F., Wu, W., Qu, Y., and Zhou, L. (2015). Plasticity of motor network and function in the absence of corticospinal projection. *Exp Neurol* 267, 194-208.
- Han, Q., Feng, J., Qu, Y., Ding, Y., Wang, M., So, K.F., Wu, W., and Zhou, L. (2013). Spinal cord maturation and locomotion in mice with an isolated cortex. *Neuroscience* 253, 235-244.
- Handley, E.E., Pitman, K.A., Dawkins, E., Young, K.M., Clark, R.M., Jiang, T.C., Turner, B.J., Dickson, T.C., and Blizzard, C.A. (2017). Synapse Dysfunction of Layer V Pyramidal Neurons Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model of TDP-43 Proteinopathies. *Cereb Cortex* 27, 3630-3647.
- Hansen, D.V., Rubenstein, J.L., and Kriegstein, A.R. (2011). Deriving excitatory neurons of the neocortex from pluripotent stem cells. *Neuron* 70, 645-660.
- Hashimoto, H., Yabe, T., Hirata, T., Shimizu, T., Bae, Y., Yamanaka, Y., Hirano, T., and Hibi, M. (2000). Expression of the zinc finger gene *fez*-like in zebrafish forebrain. *Mech Dev* 97, 191-195.

- Haugh, A.B., Pandyan, A.D., and Johnson, G.R. (2006). A systematic review of the Tardieu Scale for the measurement of spasticity. *Disabil Rehabil* 28, 899-907.
- Hayashi, S., Sakurai, A., Amari, M., and Okamoto, K. (2001). Pathological study of the diffuse myelin pallor in the anterolateral columns of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 188, 3-7.
- Hayashi, Y., Homma, K., and Ichijo, H. (2016). SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. *Adv Biol Regul* 60, 95-104.
- Heckman, C.J., and Enoka, R.M. (2012). Motor unit. *Compr Physiol* 2, 2629-2682.
- Heckmann, C.J., Gorassini, M.A., and Bennett, D.J. (2005). Persistent inward currents in motoneuron dendrites: implications for motor output. *Muscle Nerve* 31, 135-156.
- Henkel, J.S., Beers, D.R., Siklos, L., and Appel, S.H. (2006). The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Mol Cell Neurosci* 31, 427-437.
- Henkel, J.S., Engelhardt, J.I., Siklos, L., Simpson, E.P., Kim, S.H., Pan, T., Goodman, J.C., Siddique, T., Beers, D.R., and Appel, S.H. (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 55, 221-235.
- Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D.A., Rosenbohm, A., Dirrig-Grosch, S., D'Ambra, E., Huebecker, M., Hussain, G., Boursier-Neyret, C., Echaniz-Laguna, A., *et al.* (2015). Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and up-regulate glucosylceramide synthase. *Hum Mol Genet* 24, 7390-7405.
- Hensley, K., Abdel-Moaty, H., Hunter, J., Mhatre, M., Mou, S., Nguyen, K., Potapova, T., Pye, Q.N., Qi, M., Rice, H., *et al.* (2006). Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. *J Neuroinflammation* 3, 2.
- Herdewyn, S., Cirillo, C., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., Vanden Berghe, P., and Van Damme, P. (2014). Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43 (A315T) mice. *Mol Neurodegener* 9, 24.
- Herz, J., Reitmeir, R., Hagen, S.I., Reinboth, B.S., Guo, Z., Zechariah, A., ElAli, A., Doeppner, T.R., Bacigaluppi, M., Pluchino, S., *et al.* (2012). Intracerebroventricularly delivered VEGF promotes contralesional corticorubral plasticity after focal cerebral ischemia via mechanisms involving anti-inflammatory actions. *Neurobiol Dis* 45, 1077-1085.
- Hicks, G.G., Singh, N., Nashabi, A., Mai, S., Bozek, G., Klewes, L., Arapovic, D., White, E.K., Koury, M.J., Oltz, E.M., *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.
- Hicks, T.P., and Onodera, S. (2012). The mammalian red nucleus and its role in motor systems, including the emergence of bipedalism and language. *Prog Neurobiol* 96, 165-175.
- Higgins, C.M., Jung, C., and Xu, Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* 4, 16.
- Highstein, S.M., and Holstein, G.R. (2006). The Anatomy of the vestibular nuclei. In *Neuroanatomy of the Oculomotor System*, pp. 157-203.

- Hirano, A., Nakano, I., Kurland, L.T., Mulder, D.W., Holley, P.W., and Saccomanno, G. (1984). Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* *43*, 471-480.
- Hirata, T., Nakazawa, M., Muraoka, O., Nakayama, R., Suda, Y., and Hibi, M. (2006a). Zinc-finger genes Fez and Fez-like function in the establishment of diencephalon subdivisions. *Development* *133*, 3993-4004.
- Hirata, T., Nakazawa, M., Yoshihara, S., Miyachi, H., Kitamura, K., Yoshihara, Y., and Hibi, M. (2006b). Zinc-finger gene Fez in the olfactory sensory neurons regulates development of the olfactory bulb non-cell-autonomously. *Development* *133*, 1433-1443.
- Hirata, T., Suda, Y., Nakao, K., Narimatsu, M., Hirano, T., and Hibi, M. (2004). Zinc finger gene fez-like functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons. *Dev Dyn* *230*, 546-556.
- Hodge, R.D., Bakken, T.E., Miller, J.A., Smith, K.A., Barkan, E.R., Graybuck, L.T., Close, J.L., Long, B., Penn, O., Yao, Z., *et al.* (2018). Conserved cell types with divergent features between human and mouse cortex. *bioRxiv*, 384826.
- Horak, F.B. (2009). Postural compensation for vestibular loss. *Ann N Y Acad Sci* *1164*, 76-81.
- Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., *et al.* (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1604-1609.
- Huang, L., Xian, Q., Shen, N., Shi, L., Qu, Y., and Zhou, L. (2015). Congenital absence of corticospinal tract does not severely affect plastic changes of the developing postnatal spinal cord. *Neuroscience* *301*, 338-350.
- Huelga, S.C., Vu, A.Q., Arnold, J.D., Liang, T.Y., Liu, P.P., Yan, B.Y., Donohue, J.P., Shiue, L., Hoon, S., Brenner, S., *et al.* (2012). Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell Rep* *1*, 167-178.
- Huh, S., Siripuram, R., Lee, R.H., Turkin, V.V., O'Neill, D., Hamm, T.M., Heckman, C.J., and Manuel, M. (2017). PICs in motoneurons do not scale with the size of the animal: a possible mechanism for faster speed of muscle contraction in smaller species. *J Neurophysiol* *118*, 93-102.
- Huisman, A.M., Kuypers, H.G.J.M., and Verburgh, C.A. (1981). Quantitative differences in collateralization of the descending spinal pathways from red nucleus and other brain stem cell groups in rat as demonstrated with the multiple fluorescent retrograde tracer technique. *Brain Research* *209*, 271-286.
- Huisman, M.H., Seelen, M., de Jong, S.W., Dorresteyn, K.R., van Doormaal, P.T., van der Kooij, A.J., de Visser, M., Schelhaas, H.J., van den Berg, L.H., and Veldink, J.H. (2013). Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *84*, 976-981.
- Hulme, A., MacLennan, W.J., Ritchie, R.T., John, V.A., and Shotton, P.A. (1985). Baclofen in the elderly stroke patient its side-effects and pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* *29*, 467-469.
- Hyland, B. (1998). Neural activity related to reaching and grasping in rostral and caudal regions of rat motor cortex. *Behavioural Brain Research* *94*, 255-269.
- Ikenaka, K., Kawai, K., Katsuno, M., Huang, Z., Jiang, Y.M., Iguchi, Y., Kobayashi, K., Kimata, T., Waza, M., Tanaka, F., *et al.* (2013). dnc-1/dynactin 1 knockdown disrupts transport of autophagosomes and induces motor neuron degeneration. *PLoS One* *8*, e54511.

- Ince, P.G., Evans, J., Knopp, M., Forster, G., Hamdalla, H.H., Wharton, S.B., and Shaw, P.J. (2003). Corticospinal tract degeneration in the progressive muscular atrophy variant of ALS. *Neurology* *60*, 1252-1258.
- Indovina, I., and Sanes, J.N. (2001). On somatotopic representation centers for finger movements in human primary motor cortex and supplementary motor area. *Neuroimage* *13*, 1027-1034.
- Ishiura, H., Takahashi, Y., Mitsui, J., Yoshida, S., Kihira, T., Kokubo, Y., Kuzuhara, S., Ranum, L.P., Tamaoki, T., Ichikawa, Y., *et al.* (2012). C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch Neurol* *69*, 1154-1158.
- Israelson, A., Arbel, N., Da Cruz, S., Ilieva, H., Yamanaka, K., Shoshan-Barmatz, V., and Cleveland, D.W. (2010). Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron* *67*, 575-587.
- Jaarsma, D., Haasdijk, E.D., Grashorn, J.A., Hawkins, R., van Duijn, W., Verspaget, H.W., London, J., and Holstege, J.C. (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.
- Jaarsma, D., Rognoni, F., van Duijn, W., Verspaget, H.W., Haasdijk, E.D., and Holstege, J.C. (2001). CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol* *102*, 293-305.
- Jabre, J.F. (1981). Surface recording of the H-reflex of the flexor carpi radialis. *Muscle Nerve* *4*, 435-438.
- Jaiswal, M.K., Zech, W.D., Goos, M., Leutbecher, C., Ferri, A., Zippelius, A., Carri, M.T., Nau, R., and Keller, B.U. (2009). Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci* *10*, 64.
- Jang, S.H. (2014). The corticospinal tract from the viewpoint of brain rehabilitation. *J Rehabil Med* *46*, 193-199.
- Janssens, J., Wils, H., Kleinberger, G., Joris, G., Cuijt, I., Ceuterick-de Groote, C., Van Broeckhoven, C., and Kumar-Singh, S. (2013). Overexpression of ALS-associated p.M337V human TDP-43 in mice worsens disease features compared to wild-type human TDP-43 mice. *Mol Neurobiol* *48*, 22-35.
- Jara, J.H., Genc, B., Stanford, M.J., Pytel, P., Roos, R.P., Weintraub, S., Mesulam, M.M., Bigio, E.H., Miller, R.J., and Ozdinler, P.H. (2017). Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *J Neuroinflammation* *14*, 129.
- Jara, J.H., Villa, S.R., Khan, N.A., Bohn, M.C., and Ozdinler, P.H. (2012). AAV2 mediated retrograde transduction of corticospinal motor neurons reveals initial and selective apical dendrite degeneration in ALS. *Neurobiol Dis* *47*, 174-183.
- Jarratt, H., and Hyland, B. (1999). Neuronal activity in rat red nucleus during forelimb reach-to-grasp movements. *Neuroscience* *88*, 629-642.
- Jelsone-Swain, L., Persad, C., Votruba, K.L., Weisenbach, S.L., Johnson, T., Gruis, K.L., and Welsh, R.C. (2012). The Relationship between Depressive Symptoms, Disease State, and Cognition in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Psychol* *3*, 542.
- 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.

- Jiang, T., Handley, E., Brizuela, M., Dawkins, E., Lewis, K.E.A., Clark, R.M., Dickson, T.C., and Blizzard, C.A. (2019). Amyotrophic lateral sclerosis mutant TDP-43 may cause synaptic dysfunction through altered dendritic spine function. *Dis Model Mech* 12.
- Johann, S., Heitzer, M., Kanagaratnam, M., Goswami, A., Rizo, T., Weis, J., Troost, D., and Beyer, C. (2015). NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *Glia* 63, 2260-2273.
- Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., *et al.* (2010). Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68, 857-864.
- Johnston, C.A., Stanton, B.R., Turner, M.R., Gray, R., Blunt, A.H., Butt, D., Ampong, M.A., Shaw, C.E., Leigh, P.N., and Al-Chalabi, A. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: a population based study of inner city London. *J Neurol* 253, 1642-1643.
- Jokela, M., Huovinen, S., Raheem, O., Lindfors, M., Palmio, J., Penttila, S., and Udd, B. (2016). Distinct Muscle Biopsy Findings in Genetically Defined Adult-Onset Motor Neuron Disorders. *PLoS One* 11, e0151376.
- Jokic, N., Gonzalez de Aguilar, J.L., Dimou, L., Lin, S., Fergani, A., Ruegg, M.A., Schwab, M.E., Dupuis, L., and Loeffler, J.P. (2006). The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* 7, 1162-1167.
- Joyce, N.C., and Carter, G.T. (2013). Electrodiagnosis in persons with amyotrophic lateral sclerosis. *PM R* 5, S89-95.
- Joyce, P.I., Fratta, P., Fisher, E.M., and Acevedo-Arozena, A. (2011). SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mamm Genome* 22, 420-448.
- Juntas Morales, R., Pageot, N., Taieb, G., and Camu, W. (2017). Adult-onset spinal muscular atrophy: An update. *Rev Neurol (Paris)* 173, 308-319.
- Kabashi, E., Agar, J.N., Taylor, D.M., Minotti, S., and Durham, H.D. (2004). Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89, 1325-1335.
- Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Vande Velde, C., Bouchard, J.P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., *et al.* (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40, 572-574.
- Kamiyama, T., Kameda, H., Murabe, N., Fukuda, S., Yoshioka, N., Mizukami, H., Ozawa, K., and Sakurai, M. (2015). Corticospinal tract development and spinal cord innervation differ between cervical and lumbar targets. *J Neurosci* 35, 1181-1191.
- Kanagal, S.G., and Muir, G.D. (2009). Task-dependent compensation after pyramidal tract and dorsolateral spinal lesions in rats. *Exp Neurol* 216, 193-206.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Biochemistry, D.o., Jessell, M.B.T., Siegelbaum, S., and Hudspeth, A. (2012). *Principles of neural science*, Vol 4 (McGraw-hill New York).
- Kang, S.H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D.W., Ostrow, L.W., Rothstein, J.D., and Bergles, D.E. (2013). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 16, 571-579.



- Kanning, K.C., Kaplan, A., and Henderson, C.E. (2010). Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 33, 409-440.
- Karussis, D., Karageorgiou, C., Vaknin-Dembinsky, A., Gowda-Kurkalli, B., Gomori, J.M., Kassis, I., Bulte, J.W., Petrou, P., Ben-Hur, T., Abramsky, O., *et al.* (2010). Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 67, 1187-1194.
- Kassubek, J., Muller, H.P., Del Tredici, K., Brettschneider, J., Pinkhardt, E.H., Lule, D., Bohm, S., Braak, H., and Ludolph, A.C. (2014). Diffusion tensor imaging analysis of sequential spreading of disease in amyotrophic lateral sclerosis confirms patterns of TDP-43 pathology. *Brain* 137, 1733-1740.
- Katz, R. (1999). Presynaptic inhibition in humans: a comparison between normal and spastic patients. *J Physiol Paris* 93, 379-385.
- Kaufmann, P., Levy, G., Thompson, J.L., Delbene, M.L., Battista, V., Gordon, P.H., Rowland, L.P., Levin, B., and Mitsumoto, H. (2005). The ALSFRS<sub>r</sub> predicts survival time in an ALS clinic population. *Neurology* 64, 38-43.
- Kawahara, Y., and Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3347-3352.
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T., and McGeer, P.L. (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140, 691-707.
- Keller, A.F., Gravel, M., and Kriz, J. (2009). Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells. *Glia* 57, 1130-1142.
- Kennedy, P.R., Gibson, A.R., and Houk, J.C. (1986). Functional and anatomic differentiation between parvicellular and magnocellular regions of red nucleus in the monkey. *Brain Research* 364, 124-136.
- Kiernan, J.A., and Hudson, A.J. (1991). Changes in sizes of cortical and lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 114 ( Pt 2), 843-853.
- Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., and Zoing, M.C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 377, 942-955.
- Kikuchi, H., Almer, G., Yamashita, S., Guegan, C., Nagai, M., Xu, Z., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., 2nd, and Przedborski, S. (2006). Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6025-6030.
- Kim, H.J., Kim, N.C., Wang, Y.D., Scarborough, E.A., Moore, J., Diaz, Z., MacLea, K.S., Freibaum, B., Li, S., Molliex, A., *et al.* (2013). Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495, 467-473.
- Kim, J., Hughes, E.G., Shetty, A.S., Arlotta, P., Goff, L.A., Bergles, D.E., and Brown, S.P. (2017). Changes in the Excitability of Neocortical Neurons in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis Are Not Specific to Corticospinal Neurons and Are Modulated by Advancing Disease. *J Neurosci* 37, 9037-9053.
- Kim, W.K., Liu, X., Sandner, J., Pasmantier, M., Andrews, J., Rowland, L.P., and Mitsumoto, H. (2009). Study of 962 patients indicates progressive muscular atrophy is a form of ALS. *Neurology* 73, 1686-1692.

- Kimura, F., Fujimura, C., Ishida, S., Nakajima, H., Furutama, D., Uehara, H., Shinoda, K., Sugino, M., and Hanafusa, T. (2006). Progression rate of ALSFRS-R at time of diagnosis predicts survival time in ALS. *Neurology* *66*, 265-267.
- King, A.E., Woodhouse, A., Kirkcaldie, M.T., and Vickers, J.C. (2016). Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? *Exp Neurol* *275 Pt 1*, 162-171.
- Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Akagi, T., Hashikawa, T., Doi, H., Takumi, T., Hicks, G.G., *et al.* (2015). FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* *3*, 24.
- Kirkinezos, I.G., Bacman, S.R., Hernandez, D., Oca-Cossio, J., Arias, L.J., Perez-Pinzon, M.A., Bradley, W.G., and Moraes, C.T. (2005). Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. *J Neurosci* *25*, 164-172.
- Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L.A., Boulting, G.L., Moccia, R., Wainger, B.J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., *et al.* (2014). Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell* *14*, 781-795.
- Kleinschmidt, A., Nitschke, M.F., and Frahm, J. (1997). Somatotopy in the human motor cortex hand area. A high-resolution functional MRI study. *Eur J Neurosci* *9*, 2178-2186.
- Klim, J.R., Vance, C., and Scotter, E.L. (2019). Antisense oligonucleotide therapies for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Existing and emerging targets. *Int J Biochem Cell Biol* *110*, 149-153.
- Knippenberg, S., Thau, N., Dengler, R., and Petri, S. (2010). Significance of behavioural tests in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Behav Brain Res* *213*, 82-87.
- Koerner, D.R. (1952). Amyotrophic lateral sclerosis on Guam. *Ann Intern Med* *37*, 1204-1220.
- Koppers, M., Blokhuis, A.M., Westeneng, H.J., Terpstra, M.L., Zundel, C.A., Vieira de Sa, R., Schellevis, R.D., Waite, A.J., Blake, D.J., Veldink, J.H., *et al.* (2015). C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann Neurol* *78*, 426-438.
- Korner, S., Hendricks, M., Kollwe, K., Zapf, A., Dengler, R., Silani, V., and Petri, S. (2013). Weight loss, dysphagia and supplement intake in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): impact on quality of life and therapeutic options. *BMC Neurol* *13*, 84.
- Kraemer, B.C., Schuck, T., Wheeler, J.M., Robinson, L.C., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., and Schellenberg, G.D. (2010). Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathol* *119*, 409-419.
- Krarup, C. (2011). Lower motor neuron involvement examined by quantitative electromyography in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* *122*, 414-422.
- Krutki, P., Celichowski, J., Lochynski, D., Pogrzebna, M., and Mrowczynski, W. (2006). Interspecies differences of motor units properties in the medial gastrocnemius muscle of cat and rat. *Arch Ital Biol* *144*, 11-23.
- Kumar, V., Islam, A., Hassan, M.I., and Ahmad, F. (2016). Therapeutic progress in amyotrophic lateral sclerosis—beginning to learning. *Eur J Med Chem* *121*, 903-917.
- Kuypers, H.G. (1958). Corticobular connexions to the pons and lower brain-stem in man: an anatomical study. *Brain* *81*, 364-388.
- Kuypers, H.G.J.M. (1964). The Descending Pathways to the Spinal Cord, their Anatomy and Function. In *Organization of the Spinal Cord*, pp. 178-202.

- Kuypers, H.G.J.M. (1982). A New Look at the Organization of the Motor System. In, pp. 381-403.
- Kwiatkowski, T.J., Jr., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., *et al.* (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* *323*, 1205-1208.
- Labra, J., Menon, P., Byth, K., Morrison, S., and Vucic, S. (2016). Rate of disease progression: a prognostic biomarker in ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *87*, 628-632.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2010). TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* *19*, R46-64.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K.R., Vu, A.Q., Baughn, M., Huelga, S.C., Clutario, K.M., Ling, S.C., Liang, T.Y., Mazur, C., *et al.* (2012). Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat Neurosci* *15*, 1488-1497.
- Lai, E.C., Felice, K.J., Festoff, B.W., Gawel, M.J., Gelinas, D.F., Kratz, R., Murphy, M.F., Natter, H.M., Norris, F.H., and Rudnicki, S.A. (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.
- Lall, D., and Baloh, R.H. (2017). Microglia and C9orf72 in neuroinflammation and ALS and frontotemporal dementia. *J Clin Invest* *127*, 3250-3258.
- Lance, J.W. (1980). The control of muscle tone, reflexes, and movement: Robert Wartenberg Lecture. *Neurology* *30*, 1303-1313.
- Landers, J.E., Melki, J., Meiningner, V., Glass, J.D., van den Berg, L.H., van Es, M.A., Sapp, P.C., van Vught, P.W., McKenna-Yasek, D.M., Blauw, H.M., *et al.* (2009). Reduced expression of the Kinesin-Associated Protein 3 (KIFAP3) gene increases survival in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 9004-9009.
- Landouere, G., Zhu, P.P., Lourenco, C.M., Johnson, J.O., Toro, C., Bricceno, K.V., Rinaldi, C., Meilleur, K.G., Sangare, M., Diallo, O., *et al.* (2013). Hereditary spastic paraplegia type 43 (SPG43) is caused by mutation in C19orf12. *Hum Mutat* *34*, 1357-1360.
- Lattante, S., Rouleau, G.A., and Kabashi, E. (2013). TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Hum Mutat* *34*, 812-826.
- Lau, D.H.W., Hartopp, N., Welsh, N.J., Mueller, S., Glennon, E.B., Morotz, G.M., Annibali, A., Gomez-Suaga, P., Stoica, R., Paillusson, S., *et al.* (2018). Disruption of ER-mitochondria signalling in fronto-temporal dementia and related amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Dis* *9*, 327.
- Lawrence, D.G., and Kuypers, H.G. (1968a). The functional organization of the motor system in the monkey. I. The effects of bilateral pyramidal lesions. *Brain* *91*, 1-14.
- Lawrence, D.G., and Kuypers, H.G. (1968b). The functional organization of the motor system in the monkey. II. The effects of lesions of the descending brain-stem pathways. *Brain* *91*, 15-36.
- Le, N.T., Chang, L., Kovlyagina, I., Georgiou, P., Safren, N., Braunstein, K.E., Kvarita, M.D., Van Dyke, A.M., LeGates, T.A., Philips, T., *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.
- Leblond, H., L'Espérance, M., Orsal, D., and Rossignol, S. (2003). Treadmill Locomotion in the Intact and Spinal Mouse. *The Journal of Neuroscience* *23*, 11411-11419.

- Lee, R.H., and Heckman, C.J. (2000). Adjustable amplification of synaptic input in the dendrites of spinal motoneurons in vivo. *J Neurosci* 20, 6734-6740.
- Lee, S., Toda, T., Kiyama, H., and Yamashita, T. (2014). Weakened rate-dependent depression of Hoffmann's reflex and increased motoneuron hyperactivity after motor cortical infarction in mice. *Cell Death Dis* 5, e1007.
- Lee, Y.B., Chen, H.J., Peres, J.N., Gomez-Deza, J., Attig, J., Stalekar, M., Troakes, C., Nishimura, A.L., Scotter, E.L., Vance, C., *et al.* (2013). Hexanucleotide repeats in ALS/FTD form length-dependent RNA foci, sequester RNA binding proteins, and are neurotoxic. *Cell Rep* 5, 1178-1186.
- Lemon, R.N. (2008). Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci* 31, 195-218.
- Lemon, R.N., and Griffiths, J. (2005). Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization? *Muscle Nerve* 32, 261-279.
- Lemon, R.N., Kirkwood, P.A., Maier, M.A., Nakajima, K., and Nathan, P. (2004). Direct and indirect pathways for corticospinal control of upper limb motoneurons in the primate. In *Brain Mechanisms for the Integration of Posture and Movement*, pp. 263-279.
- Levine, A.J., Lewallen, K.A., and Pfaff, S.L. (2012). Spatial organization of cortical and spinal neurons controlling motor behavior. *Curr Opin Neurobiol* 22, 812-821.
- Levine, J.B., Kong, J., Nadler, M., and Xu, Z. (1999). Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* 28, 215-224.
- Levy, J.R., Sumner, C.J., Caviston, J.P., Tokito, M.K., Ranganathan, S., Ligon, L.A., Wallace, K.E., LaMonte, B.H., Harmison, G.G., Puls, I., *et al.* (2006). A motor neuron disease-associated mutation in p150Glued perturbs dynactin function and induces protein aggregation. *J Cell Biol* 172, 733-745.
- Leyton, A.S.F., and Sherrington, C.S. (1917). Observations on the Excitable Cortex of the Chimpanzee, Orang-Utan, and Gorilla. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 11, 135-222.
- Li, L., Zhang, X., and Le, W. (2008). Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy* 4, 290-293.
- Li, X., Murray, K., Harvey, P.J., Ballou, E.W., and Bennett, D.J. (2007). Serotonin facilitates a persistent calcium current in motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *J Neurophysiol* 97, 1236-1246.
- Li, Y., and Bennett, D.J. (2003). Persistent sodium and calcium currents cause plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. *J Neurophysiol* 90, 857-869.
- Li, Z., Lu, Y., Xu, X.L., and Gao, F.B. (2013). The FTD/ALS-associated RNA-binding protein TDP-43 regulates the robustness of neuronal specification through microRNA-9a in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 22, 218-225.
- Liang, H., Paxinos, G., and Watson, C. (2012). The red nucleus and the rubrospinal projection in the mouse. *Brain Struct Funct* 217, 221-232.
- Liewluck, T., and Saperstein, D.S. (2015). Progressive Muscular Atrophy. *Neurol Clin* 33, 761-773.
- Lillo, P., and Hodges, J.R. (2009). Frontotemporal dementia and motor neurone disease: overlapping clinic-pathological disorders. *J Clin Neurosci* 16, 1131-1135.
- Lin, Y., Protter, D.S., Rosen, M.K., and Parker, R. (2015). Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Mol Cell* 60, 208-219.

- Lindauer, E., Dupuis, L., Muller, H.P., Neumann, H., Ludolph, A.C., and Kassubek, J. (2013). Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* *8*, e67783.
- Ling, S.C., Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2013). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* *79*, 416-438.
- Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P.A., Vande Velde, C., Ward, C.M., Miller, T.M., Subramaniam, J.R., Rothstein, J.D., Marklund, S., Andersen, P.M., *et al.* (2004). Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* *43*, 5-17.
- Liu, X., Chen, J., Liu, W., Li, X., Chen, Q., Liu, T., Gao, S., and Deng, M. (2015). The fused in sarcoma protein forms cytoplasmic aggregates in motor neurons derived from integration-free induced pluripotent stem cells generated from a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the FUS-P525L mutation. *Neurogenetics* *16*, 223-231.
- Liu, Y., Pattamatta, A., Zu, T., Reid, T., Bardhi, O., Borchelt, D.R., Yachnis, A.T., and Ranum, L.P. (2016). C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron* *90*, 521-534.
- Lobsiger, C.S., Boillee, S., McAlonis-Downes, M., Khan, A.M., Feltri, M.L., Yamanaka, K., and Cleveland, D.W. (2009). Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 4465-4470.
- Lock, T.M., Baizer, J.S., and Bender, D.B. (2003). Distribution of corticotectal cells in macaque. *Exp Brain Res* *151*, 455-470.
- Lodato, S., and Arlotta, P. (2015). Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *Annu Rev Cell Dev Biol* *31*, 699-720.
- Lodato, S., Molyneaux, B.J., Zuccaro, E., Goff, L.A., Chen, H.H., Yuan, W., Meleski, A., Takahashi, E., Mahony, S., Rinn, J.L., *et al.* (2014). Gene co-regulation by Fezf2 selects neurotransmitter identity and connectivity of corticospinal neurons. *Nat Neurosci* *17*, 1046-1054.
- Lodato, S., Rouaux, C., Quast, K.B., Jantrachotechatchawan, C., Studer, M., Hensch, T.K., and Arlotta, P. (2011). Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* *69*, 763-779.
- Lodato, S., Shetty, A.S., and Arlotta, P. (2015). Cerebral cortex assembly: generating and reprogramming projection neuron diversity. *Trends Neurosci* *38*, 117-125.
- Loeffler, J.P., Picchiarelli, G., Dupuis, L., and Gonzalez De Aguilar, J.L. (2016). The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathol* *26*, 227-236.
- Logroscino, G., Tortelli, R., Rizzo, G., Marin, B., Preux, P.M., and Malaspina, A. (2015). Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Aging-Related Disease. *Current Geriatrics Reports* *4*, 142-153.
- Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chio, A., Couratier, P., Mitchell, J.D., Swingler, R.J., Beghi, E., and Euralis (2008). Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *79*, 6-11.
- Lomen-Hoerth, C., Anderson, T., and Miller, B. (2002). The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* *59*, 1077-1079.
- Lotze, M., Erb, M., Flor, H., Huelsmann, E., Godde, B., and Grodd, W. (2000). fMRI evaluation of somatotopic representation in human primary motor cortex. *Neuroimage* *11*, 473-481.

- Lu, C.H., Allen, K., Oei, F., Leoni, E., Kuhle, J., Tree, T., Fratta, P., Sharma, N., Sidle, K., Howard, R., *et al.* (2016). Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3, e244.
- Ludolph, A., Drory, V., Hardiman, O., Nakano, I., Ravits, J., Robberecht, W., Shefner, J., and ALS/MND, W.F.N.R.G.O. (2015). A revision of the El Escorial criteria - 2015. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 16, 291-292.
- Lutz, C. (2018). Mouse models of ALS: Past, present and future. *Brain Res* 1693, 1-10.
- Maekawa, S., Al-Sarraj, S., Kibble, M., Landau, S., Parnavelas, J., Cotter, D., Everall, I., and Leigh, P.N. (2004). Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain* 127, 1237-1251.
- Magoun, H.W., and Rhines, R. (1946). An inhibitory mechanism in the bulbar reticular formation. *J Neurophysiol* 9, 165-171.
- Magrane, J., Cortez, C., Gan, W.B., and Manfredi, G. (2014). Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum Mol Genet* 23, 1413-1424.
- Majounie, E., Renton, A.E., Mok, K., Dopper, E.G.P., Waite, A., Rollinson, S., Chiò, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., *et al.* (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *The Lancet Neurology* 11, 323-330.
- Majumder, P., Chen, Y.T., Bose, J.K., Wu, C.C., Cheng, W.C., Cheng, S.J., Fang, Y.H., Chen, Y.L., Tsai, K.J., Lien, C.C., *et al.* (2012). TDP-43 regulates the mammalian spinogenesis through translational repression of Rac1. *Acta Neuropathol* 124, 231-245.
- Malek, A.M., Barchowsky, A., Bowser, R., Youk, A., and Talbott, E.O. (2012). Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis of epidemiological studies: pesticide exposure as a risk factor for ALS. *Environ Res* 117, 112-119.
- Malessa, S., Leigh, P.N., Bertel, O., Sluga, E., and Hornykiewicz, O. (1991). Amyotrophic lateral sclerosis: glutamate dehydrogenase and transmitter amino acids in the spinal cord. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54, 984-988.
- Mancuso, R., Santos-Nogueira, E., Osta, R., and Navarro, X. (2011). Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clin Neurophysiol* 122, 1660-1670.
- Maniecka, Z., and Polymenidou, M. (2015). From nucleation to widespread propagation: A prion-like concept for ALS. *Virus Res* 207, 94-105.
- Manjaly, Z.R., Scott, K.M., Abhinav, K., Wijesekera, L., Ganesalingam, J., Goldstein, L.H., Janssen, A., Dougherty, A., Willey, E., Stanton, B.R., *et al.* (2010). The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Amyotroph Lateral Scler* 11, 439-442.
- Manuel, M., Chardon, M., Tysseling, V., and Heckman, C.J. (2019). Scaling of Motor Output, From Mouse to Humans. *Physiology (Bethesda)* 34, 5-13.
- Manuel, M., and Heckman, C.J. (2011). Adult mouse motor units develop almost all of their force in the subprimary range: a new all-or-none strategy for force recruitment? *J Neurosci* 31, 15188-15194.
- Marcuzzo, S., Zucca, I., Mastropietro, A., de Rosbo, N.K., Cavalcante, P., Tartari, S., Bonanno, S., Preite, L., Mantegazza, R., and Bernasconi, P. (2011). Hind limb muscle atrophy precedes cerebral neuronal

degeneration in G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a longitudinal MRI study. *Exp Neurol* 231, 30-37.

- Marin, B., Desport, J.C., Kajeu, P., Jesus, P., Nicolaud, B., Nicol, M., Preux, P.M., and Couratier, P. (2011). Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82, 628-634.
- Marin, B., Hamidou, B., Couratier, P., Nicol, M., Delzor, A., Raymondeau, M., Druet-Cabanac, M., Lautrette, G., Boumediene, F., Preux, P.M., *et al.* (2014). Population-based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in an ageing Europe--the French register of ALS in Limousin (FRALim register). *Eur J Neurol* 21, 1292-1300, e1278-1299.
- Marques, C., Fischer, M., Keime, C., Burg, T., Brunet, A., Scekcic-Zahirovic, J., and Rouaux, C. (2019a). Early alterations of RNA metabolism and splicing from adult corticospinal neurons in an ALS mouse model. *bioRxiv*, 667733.
- Marques, C., Fischer, M., Keime, C., Burg, T., Brunet, A., Scekcic-Zahirovic, J., and Rouaux, C. (2019b). Early alterations of RNA metabolism and splicing from adult corticospinal neurons in an ALS mouse model.
- Marrocco, R.T. (1978). Conduction velocities of afferent input to superior colliculus in normal and decorticate monkeys. *Brain Research* 140, 155-158.
- Martin, L.J., Liu, Z., Chen, K., Price, A.C., Pan, Y., Swaby, J.A., and Golden, W.C. (2007). Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J Comp Neurol* 500, 20-46.
- Martineau, E., Di Polo, A., Vande Velde, C., and Robitaille, R. (2018). Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS. *Elife* 7.
- Martinez, A., Palomo Ruiz, M.D., Perez, D.I., and Gil, C. (2017). Drugs in clinical development for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 26, 403-414.
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., *et al.* (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465, 223-226.
- Massion, J. (1967). The mammalian red nucleus. *Physiol Rev* 47, 383-436.
- Massion, J. (1988). Red nucleus: past and future. *Behavioural Brain Research* 28, 1-8.
- Matsumoto, G., Stojanovic, A., Holmberg, C.I., Kim, S., and Morimoto, R.I. (2005). Structural properties and neuronal toxicity of amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu/Zn superoxide dismutase 1 aggregates. *J Cell Biol* 171, 75-85.
- Mattiuzzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277, 29626-29633.
- May, P.J. (2006). The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. In *Neuroanatomy of the Oculomotor System*, pp. 321-378.
- May, P.J., and Porter, J.D. (1992). The laminar distribution of macaque tectobulbar and tectospinal neurons. *Vis Neurosci* 8, 257-276.

- Mazzini, L., Ferrari, D., Andjus, P.R., Buzanska, L., Cantello, R., De Marchi, F., Gelati, M., Giniatullin, R., Glover, J.C., Grilli, M., *et al.* (2018). Advances in stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Biol Ther* 18, 865-881.
- Mazzocchio, R., and Rossi, A. (1997). Involvement of spinal recurrent inhibition in spasticity. Further insight into the regulation of Renshaw cell activity. *Brain* 120 ( Pt 6), 991-1003.
- McCauley, M.E., and Baloh, R.H. (2019). Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol* 137, 715-730.
- McCrea, R., Gdowski, G., and Luan, H. (2001). Current concepts of vestibular nucleus function: transformation of vestibular signals in the vestibular nuclei. *Ann N Y Acad Sci* 942, 328-344.
- McCrory, P., Turner-Stokes, L., Baguley, I.J., De Graaff, S., Katrak, P., Sandanam, J., Davies, L., Munns, M., and Hughes, A. (2009). Botulinum toxin A for treatment of upper limb spasticity following stroke: a multi-centre randomized placebo-controlled study of the effects on quality of life and other person-centred outcomes. *J Rehabil Med* 41, 536-544.
- Meissner, F., Molawi, K., and Zychlinsky, A. (2010). Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1beta accelerates ALS pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13046-13050.
- Menon, P., Geevasinga, N., Yiannikas, C., Howells, J., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2015). Sensitivity and specificity of threshold tracking transcranial magnetic stimulation for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *The Lancet Neurology* 14, 478-484.
- Menon, P., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2014). Cortical dysfunction underlies the development of the split-hand in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 9, e87124.
- Meyer, K., Ferraiuolo, L., Miranda, C.J., Likhite, S., McElroy, S., Rensch, S., Ditsworth, D., Lagier-Tourenne, C., Smith, R.A., Ravits, J., *et al.* (2014). Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 829-832.
- Mezzapesa, D.M., D'Errico, E., Tortelli, R., Distaso, E., Cortese, R., Tursi, M., Federico, F., Zoccolella, S., Logroscino, G., Dicuonzo, F., *et al.* (2013). Cortical thinning and clinical heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 8, e80748.
- Milan, L., Barriere, G., De Deurwaerdere, P., Cazalets, J.R., and Bertrand, S.S. (2014). Monoaminergic control of spinal locomotor networks in SOD1G93A newborn mice. *Front Neural Circuits* 8, 77.
- Millecamps, S., Boillee, S., Le Ber, I., Seilhean, D., Teyssou, E., Giraudeau, M., Moigneu, C., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Corcia, P., *et al.* (2012). Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes. *J Med Genet* 49, 258-263.
- Miller, D.J., Bhaduri, A., Sestan, N., and Kriegstein, A. (2019). Shared and derived features of cellular diversity in the human cerebral cortex. *Current opinion in neurobiology* 56, 117-124.
- Miller, R.A., and Strominger, N.L. (1973). Efferent connections of the red nucleus in the brainstem and spinal cord of the Rhesus monkey. *J Comp Neurol* 152, 327-345.
- Miller, R.G., Mitchell, J.D., and Moore, D.H. (2012). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*, CD001447.
- Miller, T.M., Kim, S.H., Yamanaka, K., Hester, M., Umaphathi, P., Arnson, H., Rizo, L., Mendell, J.R., Gage, F.H., Cleveland, D.W., *et al.* (2006). Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for



non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19546-19551.

- Mills, K.R., and Nithi, K.A. (1997). Corticomotor threshold is reduced in early sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 20, 1137-1141.
- Mills, K.R., and Nithi, K.A. (1998). Peripheral and central motor conduction in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 159, 82-87.
- Mitchell, J.C., Constable, R., So, E., Vance, C., Scotter, E., Glover, L., Hortobagyi, T., Arnold, E.S., Ling, S.C., McAlonis, M., *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.
- Mitchell, J.C., McGoldrick, P., Vance, C., Hortobagyi, T., Sreedharan, J., Rogelj, B., Tudor, E.L., Smith, B.N., Klasen, C., Miller, C.C., *et al.* (2013). Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol* 125, 273-288.
- Mizusawa, H., Matsumoto, S., Yen, S.H., Hirano, A., Rojas-Corona, R.R., and Donnerfeld, H. (1989). Focal accumulation of phosphorylated neurofilaments within anterior horn cell in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 79, 37-43.
- Mochizuki, Y., Mizutani, T., Shimizu, T., and Kawata, A. (2011). Proportional neuronal loss between the primary motor and sensory cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 503, 73-75.
- Mochizuki, Y., Mizutani, T., and Takasu, T. (1995). Amyotrophic lateral sclerosis with marked neurological asymmetry: clinicopathological study. *Acta Neuropathol* 90, 44-50.
- Modol, L., Mancuso, R., Ale, A., Francos-Quijorna, I., and Navarro, X. (2014). Differential effects on KCC2 expression and spasticity of ALS and traumatic injuries to motoneurons. *Front Cell Neurosci* 8, 7.
- Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A.P., Kim, H.J., Mittag, T., and Taylor, J.P. (2015). Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell* 163, 123-133.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., and Macklis, J.D. (2005). Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* 47, 817-831.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R., and Macklis, J.D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8, 427-437.
- Monaco, F., Fumero, S., Mondino, A., and Mutani, R. (1979). Plasma and cerebrospinal fluid tryptophan in multiple sclerosis and degenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 42, 640-641.
- Moreno-Lopez, Y., Olivares-Moreno, R., Cordero-Erausquin, M., and Rojas-Piloni, G. (2016). Sensorimotor Integration by Corticospinal System. *Front Neuroanat* 10, 24.
- Mori, K., Arzberger, T., Grasser, F.A., Gijssels, I., May, S., Rentzsch, K., Weng, S.M., Schludi, M.H., van der Zee, J., Cruts, M., *et al.* (2013a). Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol* 126, 881-893.
- Mori, K., Weng, S.M., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., Schmid, B., Kretschmar, H.A., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., *et al.* (2013b). The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLD/ALS. *Science* 339, 1335-1338.

- Morrison, B.M., Janssen, W.G., Gordon, J.W., and Morrison, J.H. (1998). Time course of neuropathology in the spinal cord of G86R superoxide dismutase transgenic mice. *J Comp Neurol* *391*, 64-77.
- Moura, M.C., Novaes, M.R., Eduardo, E.J., Zago, Y.S., Freitas Rdel, N., and Casulari, L.A. (2015). Prognostic Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Population-Based Study. *PLoS One* *10*, e0141500.
- Muir, G.D., Webb, A.A., Kanagal, S., and Taylor, L. (2007). Dorsolateral cervical spinal injury differentially affects forelimb and hindlimb action in rats. *Eur J Neurosci* *25*, 1501-1510.
- Muir, G.D., and Wishaw, I.Q. (1999). Complete locomotor recovery following corticospinal tract lesions: measurement of ground reaction forces during overground locomotion in rats. *Behavioural Brain Research* *103*, 45-53.
- Mukherjee, A., and Chakravarty, A. (2010). Spasticity mechanisms - for the clinician. *Front Neurol* *1*, 149.
- Muller, F.L., Song, W., Liu, Y., Chaudhuri, A., Pieke-Dahl, S., Strong, R., Huang, T.T., Epstein, C.J., Roberts, L.J., 2nd, Csete, M., *et al.* (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med* *40*, 1993-2004.
- Munch, C., Meyer, R., Linke, P., Meyer, T., Ludolph, A.C., Haas, J., and Hemmer, B. (2007). The p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* *116*, 231-234.
- Munoz, D.G., Greene, C., Perl, D.P., and Selkoe, D.J. (1988). Accumulation of phosphorylated neurofilaments in anterior horn motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol* *47*, 9-18.
- Murayama, S., Bouldin, T.W., and Suzuki, K. (1992). Immunocytochemical and ultrastructural studies of upper motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* *83*, 518-524.
- Murdock, B.J., Zhou, T., Kashlan, S.R., Little, R.J., Goutman, S.A., and Feldman, E.L. (2017). Correlation of Peripheral Immunity With Rapid Amyotrophic Lateral Sclerosis Progression. *JAMA Neurol* *74*, 1446-1454.
- Murray, K.C., Nakae, A., Stephens, M.J., Rank, M., D'Amico, J., Harvey, P.J., Li, X., Harris, R.L., Ballou, E.W., Anelli, R., *et al.* (2010). Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Nat Med* *16*, 694-700.
- Murray, K.C., Stephens, M.J., Ballou, E.W., Heckman, C.J., and Bennett, D.J. (2011). Motoneuron excitability and muscle spasms are regulated by 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor activity. *J Neurophysiol* *105*, 731-748.
- Mustfa, N., Walsh, E., Bryant, V., Lyall, R.A., Addington-Hall, J., Goldstein, L.H., Donaldson, N., Polkey, M.I., Moxham, J., and Leigh, P.N. (2006). The effect of noninvasive ventilation on ALS patients and their caregivers. *Neurology* *66*, 1211-1217.
- Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H., and Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* *10*, 615-622.
- Nagy, D., Kato, T., and Kushner, P.D. (1994). Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* *38*, 336-347.
- Nassif, M., Woehlbier, U., and Manque, P.A. (2017). The Enigmatic Role of C9ORF72 in Autophagy. *Front Neurosci* *11*, 442.

- Nathan, P.W., Smith, M., and Deacon, P. (1996). Vestibulospinal, reticulospinal and descending propriospinal nerve fibres in man. *Brain* 119 ( Pt 6), 1809-1833.
- Nathan, P.W., and Smith, M.C. (1982). The rubrospinal and central tegmental tracts in man. *Brain* 105, 223-269.
- Nathan, P.W., Smith, M.C., and Deacon, P. (1990). The corticospinal tracts in man. Course and location of fibres at different segmental levels. *Brain* 113 ( Pt 2), 303-324.
- Naus, C.G., Flumerfelt, B.A., and Hryciyshyn, A.W. (1985). An HRP-TMB ultrastructural study of rubral afferents in the rat. *J Comp Neurol* 239, 453-465.
- Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26, 523-530.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., *et al.* (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130-133.
- Nguyen, H.P., Van Broeckhoven, C., and van der Zee, J. (2018). ALS Genes in the Genomic Era and their Implications for FTD. *Trends Genet* 34, 404-423.
- Nguyen, M.D., Julien, J.-P., and Rivest, S. (2001). Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: No requirement for proapoptotic interleukin-1? in neurodegeneration. *Annals of Neurology* 50, 630-639.
- Nicolas, A., Kenna, K.P., Renton, A.E., Ticozzi, N., Faghri, F., Chia, R., Dominov, J.A., Kenna, B.J., Nalls, M.A., Keagle, P., *et al.* (2018). Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. *Neuron* 97, 1268-1283 e1266.
- Niebroj-Dobosz, I., Rafalowska, J., Fidzianska, A., Gadamski, R., and Grieb, P. (2007). Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in SOD1G93A transgenic rats. *Folia Neuropathol* 45, 236-241.
- Nielsen, J., Petersen, N., and Crone, C. (1995). Changes in transmission across synapses of Ia afferents in spastic patients. *Brain* 118 ( Pt 4), 995-1004.
- Nielsen, J.B., Crone, C., and Hultborn, H. (2007). The spinal pathophysiology of spasticity--from a basic science point of view. *Acta Physiol (Oxf)* 189, 171-180.
- Nihei, K., McKee, A.C., and Kowall, N.W. (1993). Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol* 86, 55-64.
- Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., and Ichijo, H. (2008). ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* 22, 1451-1464.
- Norris, F., Shepherd, R., Denys, E., U, K., Mukai, E., Elias, L., Holden, D., and Norris, H. (1993). Onset, natural history and outcome in idiopathic adult motor neuron disease. *Journal of the Neurological Sciences* 118, 48-55.
- Nudo, R.J., and Masterton, R.B. (1988). Descending pathways to the spinal cord: a comparative study of 22 mammals. *J Comp Neurol* 277, 53-79.
- Nudo, R.J., and Masterton, R.B. (1990). Descending pathways to the spinal cord, III: Sites of origin of the corticospinal tract. *J Comp Neurol* 296, 559-583.

- O'Reilly, E.J., Wang, H., Weisskopf, M.G., Fitzgerald, K.C., Falcone, G., McCullough, M.L., Thun, M., Park, Y., Kolonel, L.N., and Ascherio, A. (2013). Premorbid body mass index and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14, 205-211.
- O'Rourke, J.G., Bogdanik, L., Yanez, A., Lall, D., Wolf, A.J., Muhammad, A.K., Ho, R., Carmona, S., Vit, J.P., Zarrow, J., *et al.* (2016). C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science* 351, 1324-1329.
- Oh, Y.S., Kim, S.H., and Cho, G.W. (2016). Functional Restoration of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Mesenchymal Stromal Cells Through Inhibition of DNA Methyltransferase. *Cell Mol Neurobiol* 36, 613-620.
- Ohsugi, K., Adachi, K., Mukoyama, M., and Ando, K. (1987). Lack of change in indoleamine metabolism in spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* 79, 351-354.
- Okamoto, K., Hirai, S., Amari, M., Iizuka, T., Watanabe, M., Murakami, N., and Takatama, M. (1993). Oculomotor nuclear pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 85, 458-462.
- Okamoto, K., Hirai, S., Shoji, M., Senoh, Y., and Yamazaki, T. (1990). Axonal swellings in the corticospinal tracts in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 80, 222-226.
- Oluwole, S.O., Yao, Y., Conradi, S., Kristensson, K., and Karlsson, H. (2007). Elevated levels of transcripts encoding a human retroviral envelope protein (syncytin) in muscles from patients with motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler* 8, 67-72.
- Onesto, E., Colombrita, C., Gumina, V., Borghi, M.O., Dusi, S., Doretti, A., Fagiolari, G., Invernizzi, F., Moggio, M., Tiranti, V., *et al.* (2016). Gene-specific mitochondria dysfunctions in human TARDBP and C9ORF72 fibroblasts. *Acta Neuropathol Commun* 4, 47.
- Onesto, E., Rusmini, P., Crippa, V., Ferri, N., Zito, A., Galbiati, M., and Poletti, A. (2011). Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 118, 266-280.
- Ono, S. (2000). The skin in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1, 191-199.
- Onodera, S., and Hicks, T.P. (2010). Carbocyanine dye usage in demarcating boundaries of the aged human red nucleus. *PLoS One* 5, e14430.
- Otaegi, G., Pollock, A., Hong, J., and Sun, T. (2011). MicroRNA miR-9 modifies motor neuron columns by a tuning regulation of FoxP1 levels in developing spinal cords. *J Neurosci* 31, 809-818.
- Oxbury, J.M. (1970). Prefrontal lesions in man and monkey. *Brain Res* 24, 555.
- Oyanagi, K., Yamazaki, M., Takahashi, H., Watabe, K., Wada, M., Komori, T., Morita, T., and Mizutani, T. (2008). Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34, 650-658.
- Ozdinler, P.H., Benn, S., Yamamoto, T.H., Guzel, M., Brown, R.H., Jr., and Macklis, J.D. (2011). Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *J Neurosci* 31, 4166-4177.
- Pagani, M., Chio, A., Valentini, M.C., Oberg, J., Nobili, F., Calvo, A., Moglia, C., Bertuzzo, D., Morbelli, S., De Carli, F., *et al.* (2014). Functional pattern of brain FDG-PET in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 83, 1067-1074.

- Paganoni, S., Karam, C., Joyce, N., Bedlack, R., and Carter, G.T. (2015). Comprehensive rehabilitative care across the spectrum of amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroRehabilitation* 37, 53-68.
- Paganoni, S., Macklin, E.A., Lee, A., Murphy, A., Chang, J., Zipf, A., Cudkowicz, M., and Atassi, N. (2014). Diagnostic timelines and delays in diagnosing amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 15, 453-456.
- Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S.T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A.L., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J.P., *et al.* (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol Med* 7, 526-546.
- Palma, E., Inghilleri, M., Conti, L., Deflorio, C., Frasca, V., Manteca, A., Pichiorri, F., Roseti, C., Torchia, G., Limatola, C., *et al.* (2011). Physiological characterization of human muscle acetylcholine receptors from ALS patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20184-20188.
- Palomero-Gallagher, N., and Zilles, K. (2017). Cortical layers: Cyto-, myelo-, receptor- and synaptic architecture in human cortical areas. *Neuroimage*.
- Pamphlett, R., Kril, J., and Hng, T.M. (1995). Motor neuron disease: a primary disorder of corticomotoneurons? *Muscle Nerve* 18, 314-318.
- Panzeri, C., De Palma, C., Martinuzzi, A., Daga, A., De Polo, G., Bresolin, N., Miller, C.C., Tudor, E.L., Clementi, E., and Bassi, M.T. (2006). The first ALS2 missense mutation associated with JPLS reveals new aspects of alsin biological function. *Brain* 129, 1710-1719.
- Papadeas, S.T., Kraig, S.E., O'Banion, C., Lepore, A.C., and Maragakis, N.J. (2011). Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17803-17808.
- Park, H.G., and Carmel, J.B. (2016). Selective Manipulation of Neural Circuits. *Neurotherapeutics* 13, 311-324.
- Park, K.H., and Vincent, I. (2008). Presymptomatic biochemical changes in hindlimb muscle of G93A human Cu/Zn superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1782, 462-468.
- Park, Y., Park, J., Kim, Y., Baek, H., and Kim, S.H. (2015). Association between nutritional status and disease severity using the amyotrophic lateral sclerosis (ALS) functional rating scale in ALS patients. *Nutrition* 31, 1362-1367.
- Parkinson, N., Ince, P.G., Smith, M.O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P.M., Morrison, K.E., Pall, H.S., Hardiman, O., Collinge, J., *et al.* (2006). ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 67, 1074-1077.
- Pasinelli, P., Belford, M.E., Lennon, N., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., Trotti, D., and Brown, R.H., Jr. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 43, 19-30.
- Patel, A., Lee, H.O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M.Y., Stoynev, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T.M., *et al.* (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* 162, 1066-1077.
- Pedrini, S., Sau, D., Guareschi, S., Bogush, M., Brown, R.H., Jr., Nanche, N., Kia, A., Trotti, D., and Pasinelli, P. (2010). ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Hum Mol Genet* 19, 2974-2986.

- Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M.R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J.S., Estevez, A.G., and Barbeito, L. (2004). Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89, 464-473.
- Penfield, W., and Boldrey, E. (1937). Somatic Motor and Sensory Representation in the Cerebral Cortex of Man as Studied by Electrical Stimulation. *Brain* 60, 389-443.
- Penfield, W., and Welch, K. (1951). The supplementary motor area of the cerebral cortex; a clinical and experimental study. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 66, 289-317.
- Pensato, V., Tiloca, C., Corrado, L., Bertolin, C., Sardone, V., Del Bo, R., Calini, D., Mandrioli, J., Lauria, G., Mazzini, L., *et al.* (2015). TUBA4A gene analysis in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: identification of novel mutations. *J Neurol* 262, 1376-1378.
- Peter, R.S., Rosenbohm, A., Dupuis, L., Brehme, T., Kassubek, J., Rothenbacher, D., Nagel, G., and Ludolph, A.C. (2017). Life course body mass index and risk and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: results from the ALS registry Swabia. *Eur J Epidemiol* 32, 901-908.
- Peters, O.M., Cabrera, G.T., Tran, H., Gendron, T.F., McKeon, J.E., Metterville, J., Weiss, A., Wightman, N., Salameh, J., Kim, 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.
- Petri, S., Kollwe, K., Grothe, C., Hori, A., Dengler, R., Bufler, J., and Krampfl, K. (2006). GABA(A)-receptor mRNA expression in the prefrontal and temporal cortex of ALS patients. *J Neurol Sci* 250, 124-132.
- Petri, S., Krampfl, K., Hashemi, F., Grothe, C., Hori, A., Dengler, R., and Bufler, J. (2003). Distribution of GABAA receptor mRNA in the motor cortex of ALS patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 1041-1051.
- Petrik, M.S., Wilson, J.M., Grant, S.C., Blackband, S.J., Tabata, R.C., Shan, X., Krieger, C., and Shaw, C.A. (2007). Magnetic resonance microscopy and immunohistochemistry of the CNS of the mutant SOD murine model of ALS reveals widespread neural deficits. *Neuromolecular Med* 9, 216-229.
- Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., and Hermine, O. (2017). ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? *Front Aging Neurosci* 9, 68.
- Philips, T., and Rothstein, J.D. (2015). Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol* 69, 5 67 61-21.
- Phukan, J., Elamin, M., Bede, P., Jordan, N., Gallagher, L., Byrne, S., Lynch, C., Pender, N., and Hardiman, O. (2012). The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83, 102-108.
- Pickles, S., Destroismaisons, L., Peyrard, S.L., Cadot, S., Rouleau, G.A., Brown, R.H., Jr., Julien, J.P., Arbour, N., and Vande Velde, C. (2013). Mitochondrial damage revealed by immunoselection for ALS-linked misfolded SOD1. *Hum Mol Genet* 22, 3947-3959.
- Pickles, S., Semmler, S., Broom, H.R., Destroismaisons, L., Legroux, L., Arbour, N., Meiering, E., Cashman, N.R., and Vande Velde, C. (2016). ALS-linked misfolded SOD1 species have divergent impacts on mitochondria. *Acta Neuropathol Commun* 4, 43.
- Pioro, E.P., Majors, A.W., Mitsumoto, H., Nelson, D.R., and Ng, T.C. (1999). 1H-MRS evidence of neurodegeneration and excess glutamate + glutamine in ALS medulla. *Neurology* 53, 71-79.
- Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K.R., Huelga, S.C., Moran, J., Liang, T.Y., Ling, S.C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., *et al.* (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci* 14, 459-468.

- Pompeiano, O. (1973). Reticular Formation. In *Somatosensory System*, A. Iggo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 381-488.
- Pradat, P.F., Bruneteau, G., Gordon, P.H., Dupuis, L., Bonnefont-Rousselot, D., Simon, D., Salachas, F., Corcia, P., Frochet, V., Lacorte, J.M., *et al.* (2010). Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* *11*, 166-171.
- Pradat, P.F., and El Mendili, M.M. (2014). Neuroimaging to investigate multisystem involvement and provide biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int* *2014*, 467560.
- Prause, J., Goswami, A., Katona, I., Roos, A., Schnizler, M., Bushuven, E., Dreier, A., Buchkremer, S., Johann, S., Beyer, C., *et al.* (2013). Altered localization, abnormal modification and loss of function of Sigma receptor-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* *22*, 1581-1600.
- Prell, T., Lautenschlager, J., Witte, O.W., Carri, M.T., and Grosskreutz, J. (2012). The unfolded protein response in models of human mutant G93A amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* *35*, 652-660.
- Pugdahl, K., Fuglsang-Frederiksen, A., Johnsen, B., de Carvalho, M., Fawcett, P.R., Labarre-Vila, A., Liguori, R., Nix, W.A., and Schofield, I.S. (2008). A prospective multicentre study on sural nerve action potentials in ALS. *Clin Neurophysiol* *119*, 1106-1110.
- Puls, I., Jonnakuty, C., LaMonte, B.H., Holzbaur, E.L., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M.K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S.J., *et al.* (2003). Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* *33*, 455-456.
- Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L., and Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* *9*, 408-419.
- Pupillo, E., Messina, P., Giussani, G., Logroscino, G., Zoccolella, S., Chio, A., Calvo, A., Corbo, M., Lunetta, C., Marin, B., *et al.* (2014a). Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: a European population-based case-control study. *Ann Neurol* *75*, 708-716.
- Pupillo, E., Messina, P., Logroscino, G., Beghi, E., and Group, S. (2014b). Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Ann Neurol* *75*, 287-297.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., McNamara, J., and White, L. (2014). *Neuroscience*, 2008. De Boeck, Sinauer, Sunderland, Mass.
- Pyra, T., Hui, B., Hanstock, C., Concha, L., Wong, J.C., Beaulieu, C., Johnston, W., and Kalra, S. (2010). Combined structural and neurochemical evaluation of the corticospinal tract in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* *11*, 157-165.
- Qian, J., Wu, W., Xiong, W., Chai, Z., Xu, X.M., and Jin, X. (2019). Longitudinal Optogenetic Motor Mapping Revealed Structural and Functional Impairments and Enhanced Corticorubral Projection after Contusive Spinal Cord Injury in Mice. *J Neurotrauma* *36*, 485-499.
- Qiu, H., Lee, S., Shang, Y., Wang, W.Y., Au, K.F., Kamiya, S., Barmada, S.J., Finkbeiner, S., Lui, H., Carlton, C.E., *et al.* (2014). ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects. *J Clin Invest* *124*, 981-999.
- Rabkin, J.G., Goetz, R., Factor-Litvak, P., Hupf, J., McElhiney, M., Singleton, J., Mitsumoto, H., and Als Cosmos Study, G. (2015). Depression and wish to die in a multicenter cohort of ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* *16*, 265-273.
- Raineteau, O., Fouad, K., Bareyre, F.M., and Schwab, M.E. (2002). Reorganization of descending motor tracts in the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience* *16*, 1761-1771.

- Raineteau, O., and Schwab, M.E. (2001). Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 2, 263-273.
- Raineteau, O., Z'Graggen, W.J., Thallmair, M., and Schwab, M.E. (1999). Sprouting and regeneration after pyramidotomy and blockade of the myelin-associated neurite growth inhibitors NI 35/250 in adult rats. *European Journal of Neuroscience* 11, 1486-1490.
- Rakhit, R., Cunningham, P., Furtos-Matei, A., Dahan, S., Qi, X.F., Crow, J.P., Cashman, N.R., Kondejewski, L.H., and Chakrabartty, A. (2002). Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 277, 47551-47556.
- Rank, M.M., Murray, K.C., Stephens, M.J., D'Amico, J., Gorassini, M.A., and Bennett, D.J. (2011). Adrenergic receptors modulate motoneuron excitability, sensory synaptic transmission and muscle spasms after chronic spinal cord injury. *J Neurophysiol* 105, 410-422.
- Rao, S.M., Binder, J.R., Hammeke, T.A., Bandettini, P.A., Bobholz, J.A., Frost, J.A., Myklebust, B.M., Jacobson, R.D., and Hyde, J.S. (1995). Somatotopic mapping of the human primary motor cortex with functional magnetic resonance imaging. *Neurology* 45, 919-924.
- Ravits, J., Laurie, P., Fan, Y., and Moore, D.H. (2007a). Implications of ALS focality: rostral-caudal distribution of lower motor neuron loss postmortem. *Neurology* 68, 1576-1582.
- Ravits, J., Paul, P., and Jorg, C. (2007b). Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology* 68, 1571-1575.
- Ravits, J.M., and La Spada, A.R. (2009). ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology* 73, 805-811.
- Raynor, E.M., and Shefner, J.M. (1994). Recurrent inhibition is decreased in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 44, 2148-2153.
- 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.
- Renton, A.E., Chio, A., and Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 17, 17-23.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., *et al.* (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257-268.
- Reppucci, C.J., and Petrovich, G.D. (2016). Organization of connections between the amygdala, medial prefrontal cortex, and lateral hypothalamus: a single and double retrograde tracing study in rats. *Brain Struct Funct* 221, 2937-2962.
- Ribeiro-do-Valle, L.E., Metzler, C.W., and Jacobs, B.L. (1991). Facilitation of masseter EMG and masseteric (jaw-closure) reflex by serotonin in behaving cats. *Brain Research* 550, 197-204.
- Riku, Y., Atsuta, N., Yoshida, M., Tatsumi, S., Iwasaki, Y., Mimuro, M., Watanabe, H., Ito, M., Senda, J., Nakamura, R., *et al.* (2014). Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open* 4, e005213.
- Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., Morrison, J.H., and Gordon, J.W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 689-693.



- Rivara, C.B., Sherwood, C.C., Bouras, C., and Hof, P.R. (2003). Stereologic characterization and spatial distribution patterns of Betz cells in the human primary motor cortex. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 270, 137-151.
- Riviere, M., Meininger, V., Zeisser, P., and Munsat, T. (1998). An Analysis of Extended Survival in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis Treated With Riluzole. *Archives of Neurology* 55.
- Rizzolatti, G., Fadiga, L., Gallese, V., and Fogassi, L. (1996). Premotor cortex and the recognition of motor actions. *Brain Res Cogn Brain Res* 3, 131-141.
- Rizzolatti, G., Luppino, G., and Matelli, M. (1998). The organization of the cortical motor system: new concepts. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 106, 283-296.
- Robberecht, W., and Philips, T. (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 14, 248-264.
- Rocha, M.C., Pousinha, P.A., Correia, A.M., Sebastiao, A.M., and Ribeiro, J.A. (2013). Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS One* 8, e73846.
- Roland, P.E. (1984). Organization of motor control by the normal human brain. *Hum Neurobiol* 2, 205-216.
- Roland, P.E. (1985). Cortical organization of voluntary behavior in man. *Hum Neurobiol* 4, 155-167.
- Roland, P.E., Larsen, B., Lassen, N.A., and Skinhoj, E. (1980a). Supplementary motor area and other cortical areas in organization of voluntary movements in man. *J Neurophysiol* 43, 118-136.
- Roland, P.E., Skinhoj, E., Lassen, N.A., and Larsen, B. (1980b). Different cortical areas in man in organization of voluntary movements in extrapersonal space. *J Neurophysiol* 43, 137-150.
- 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.
- Rossi, S., Cozzolino, M., and Carri, M.T. (2016). Old versus New Mechanisms in the Pathogenesis of ALS. *Brain Pathol* 26, 276-286.
- Rossignol, S., Barriere, G., Alluin, O., and Frigon, A. (2009). Re-expression of locomotor function after partial spinal cord injury. *Physiology (Bethesda)* 24, 127-139.
- Rothstein, J.D., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326, 1464-1468.
- Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, A., Stauch, B.L., and Coyle, J.T. (1990). Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28, 18-25.
- Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Menger, Y., Boutillier, A.L., and Loeffler, J.P. (2007). Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neurosci* 27, 5535-5545.
- Rowland, L.P. (2001). How Amyotrophic Lateral Sclerosis Got Its Name. *Archives of Neurology* 58.
- Rudnik-Schoneborn, S., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Borkowska, J., and Zerres, K. (2001). The predictive value of achieved motor milestones assessed in 441 patients with infantile spinal muscular atrophy types II and III. *Eur Neurol* 45, 174-181.

- Saba, L., Viscomi, M.T., Caioli, S., Pignataro, A., Bisicchia, E., Pieri, M., Molinari, M., Ammassari-Teule, M., and Zona, C. (2016). Altered Functionality, Morphology, and Vesicular Glutamate Transporter Expression of Cortical Motor Neurons from a Presymptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cereb Cortex* 26, 1512-1528.
- Sabatelli, M., Madia, F., Conte, A., Luigetti, M., Zollino, M., Mancuso, I., Lo Monaco, M., Lippi, G., and Tonali, P. (2008). Natural history of young-adult amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 71, 876-881.
- Sadegh, C., and Macklis, J.D. (2014). Established monolayer differentiation of mouse embryonic stem cells generates heterogeneous neocortical-like neurons stalled at a stage equivalent to midcorticogenesis. *J Comp Neurol* 522, 2691-2706.
- Sadjadpour, K., and Brodal, A. (1968). The vestibular nuclei in man. A morphological study in the light of experimental findings in the cat. *J Hirnforsch* 10, 299-323.
- Sahin, N., Ugurlu, H., and Albayrak, I. (2012). The efficacy of electrical stimulation in reducing the post-stroke spasticity: a randomized controlled study. *Disabil Rehabil* 34, 151-156.
- Sakowski, S.A., Schuyler, A.D., and Feldman, E.L. (2009). Insulin-like growth factor-I for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 10, 63-73.
- Sances, S., Bruijn, L.I., Chandran, S., Eggan, K., Ho, R., Klim, J.R., Livesey, M.R., Lowry, E., Macklis, J.D., Rushton, D., *et al.* (2016). Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Nat Neurosci* 19, 542-553.
- Sandyk, R. (2006). Serotonergic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Neurosci* 116, 775-826.
- Sanes, J.N., and Schieber, M.H. (2001). Orderly somatotopy in primary motor cortex: does it exist? *Neuroimage* 13, 968-974.
- Santos, M.O., Gromicho, M., Pinto, S., and de Carvalho, M. (2018). Very late-onset amyotrophic lateral sclerosis in a Portuguese cohort. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 19, 619-622.
- Sareen, D., O'Rourke, J.G., Meera, P., Muhammad, A.K., Grant, S., Simpkinson, M., Bell, S., Carmona, S., Ornelas, L., Sahabian, A., *et al.* (2013). Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. *Sci Transl Med* 5, 208ra149.
- Sargsyan, S.A., Blackburn, D.J., Barber, S.C., Monk, P.N., and Shaw, P.J. (2009). Mutant SOD1 G93A microglia have an inflammatory phenotype and elevated production of MCP-1. *Neuroreport* 20, 1450-1455.
- Sasaki, S. (2010). Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 346-355.
- Sasaki, S. (2011). Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 70, 349-359.
- Sasaki, S., and Iwata, M. (1999a). Motor neuron disease with predominantly upper extremity involvement: a clinicopathological study. *Acta Neuropathol* 98, 645-650.
- Sasaki, S., and Iwata, M. (1999b). Ultrastructural change of synapses of Betz cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* 268, 29-32.
- Sasaki, S., and Iwata, M. (2007). Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 10-16.
- Sasaki, S., and Maruyama, S. (1994). Immunocytochemical and ultrastructural studies of the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 87, 578-585.

- Satkunam, L.E. (2003). Rehabilitation medicine: 3. Management of adult spasticity. *Cmaj* 169, 1173-1179.
- Sawada, H. (2017). Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 18, 735-738.
- Scarmeas, N., Shih, T., Stern, Y., Ottman, R., and Rowland, L.P. (2002). Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. *Neurology* 59, 773-775.
- Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H.E., Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., Allmeroth, K., Dieterle, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., *et al.* (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133, 887-906.
- Scekic-Zahirovic, J., Sindscheid, O., El Oussini, H., Jambeau, M., Sun, Y., Mersmann, S., Wagner, M., Dieterle, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., *et al.* (2016). Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J* 35, 1077-1097.
- Schieber, M.H. (2007). Chapter 2 Comparative anatomy and physiology of the corticospinal system. *Handb Clin Neurol* 82, 15-37.
- Schieppati, M., Poloni, M., and Nardone, A. (1985). Voluntary muscle release is not accompanied by H-reflex inhibition in patients with upper moto neuron lesions. *Neuroscience Letters* 61, 177-181.
- Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P., and Migheli, A. (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 139, 27-33.
- Schulthess, I., Gorges, M., Muller, H.P., Lule, D., Del Tredici, K., Ludolph, A.C., and Kassubek, J. (2016). Functional connectivity changes resemble patterns of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* 6, 38391.
- Segal, M. (2018). Muscle Overactivity in the Upper Motor Neuron Syndrome: Pathophysiology. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 29, 427-436.
- Sephton, C.F., Tang, A.A., Kulkarni, A., West, J., Brooks, M., Stubblefield, J.J., Liu, Y., Zhang, M.Q., Green, C.B., Huber, K.M., *et al.* (2014). Activity-dependent FUS dysregulation disrupts synaptic homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E4769-4778.
- Shan, X., Chiang, P.M., Price, D.L., and Wong, P.C. (2010). Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16325-16330.
- Shang, Y., and Huang, E.J. (2016). Mechanisms of FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 1647, 65-78.
- Sharp, P.S., Tyreman, N., Jones, K.E., and Gordon, T. (2018). Crush injury to motor nerves in the G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis promotes muscle reinnervation and survival of functionally intact nerve-muscle contacts. *Neurobiol Dis* 113, 33-44.
- Shaw, I.C., Fitzmaurice, P.S., Mitchell, J.D., and Lynch, P.G. (1995). Studies on cellular free radical protection mechanisms in the anterior horn from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegeneration* 4, 391-396.
- Sheean, G., and McGuire, J.R. (2009). Spastic hypertonia and movement disorders: pathophysiology, clinical presentation, and quantification. *PM R* 1, 827-833.

- Shefner, J.M., Reaume, A.G., Flood, D.G., Scott, R.W., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Upton-Rice, M., and Brown, R.H., Jr. (1999). Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* *53*, 1239-1246.
- Shelkownikova, T.A., Peters, O.M., Deykin, A.V., Connor-Robson, N., Robinson, H., Ustyugov, A.A., Bachurin, S.O., Ermolkevich, T.G., Goldman, I.L., Sadchikova, E.R., *et al.* (2013). Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice. *J Biol Chem* *288*, 25266-25274.
- Shen, D., Cui, L., Fang, J., Cui, B., Li, D., and Tai, H. (2016). Voxel-Wise Meta-Analysis of Gray Matter Changes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Aging Neurosci* *8*, 64.
- Sherman, S.J., Koshland, G.F., and Laguna, J.F. (2000). Hyper-reflexia without spasticity after unilateral infarct of the medullary pyramid. *Journal of the Neurological Sciences* *175*, 145-155.
- Shi, Y., Lin, S., Staats, K.A., Li, Y., Chang, W.H., Hung, S.T., Hendricks, E., Linares, G.R., Wang, Y., Son, E.Y., *et al.* (2018). Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nat Med* *24*, 313-325.
- Shimizu, T., and Hibi, M. (2009). Formation and patterning of the forebrain and olfactory system by zinc-finger genes *Fezf1* and *Fezf2*. *Dev Growth Differ* *51*, 221-231.
- Shimizu, T., Nagaoka, U., Nakayama, Y., Kawata, A., Kugimoto, C., Kuroiwa, Y., Kawai, M., Shimohata, T., Nishizawa, M., Mihara, B., *et al.* (2012). Reduction rate of body mass index predicts prognosis for survival in amyotrophic lateral sclerosis: a multicenter study in Japan. *Amyotroph Lateral Scler* *13*, 363-366.
- Shipp, S. (2007). Structure and function of the cerebral cortex. *Curr Biol* *17*, R443-449.
- Shoesmith, C.L., Findlater, K., Rowe, A., and Strong, M.J. (2007). Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis with respiratory onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *78*, 629-631.
- Siciliano, G., D'Avino, C., Del Corona, A., Barsacchi, R., Kusmic, C., Rocchi, A., Pastorini, E., and Murri, L. (2002). Impaired oxidative metabolism and lipid peroxidation in exercising muscle from ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* *3*, 57-62.
- Siciliano, G., Pastorini, E., Pasquali, L., Manca, M.L., Iudice, A., and Murri, L. (2001). Impaired oxidative metabolism in exercising muscle from ALS patients. *Journal of the Neurological Sciences* *191*, 61-65.
- Siegel, C.S., Fink, K.L., Strittmatter, S.M., and Cafferty, W.B. (2015). Plasticity of intact rubral projections mediates spontaneous recovery of function after corticospinal tract injury. *J Neurosci* *35*, 1443-1457.
- Siegel, J. (1979). Behavioral functions of the reticular formation. *Brain Research Reviews* *1*, 69-105.
- Siklos, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R.G., Joo, F., and Appel, S.H. (1996). Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* *39*, 203-216.
- Simon-Sanchez, J., Dopper, E.G., Cohn-Hokke, P.E., Hukema, R.K., Nicolaou, N., Seelaar, H., de Graaf, J.R., de Koning, I., van Schoor, N.M., Deeg, D.J., *et al.* (2012). The clinical and pathological phenotype of C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions. *Brain* *135*, 723-735.
- Singer, M.A., Statland, J.M., Wolfe, G.I., and Barohn, R.J. (2007). Primary lateral sclerosis. *Muscle Nerve* *35*, 291-302.

- Sinkjaer, T., Toft, E., Larsen, K., Andreassen, S., and Hansen, H.J. (1993). Non-reflex and reflex mediated ankle joint stiffness in multiple sclerosis patients with spasticity. *Muscle Nerve* 16, 69-76.
- Sivak, S., Bittsansky, M., Kurca, E., Turcanova-Koprusakova, M., Grofik, M., Nosal, V., Polacek, H., and Dobrota, D. (2010). Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with early stages of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroradiology* 52, 1079-1085.
- Smania, N., Picelli, A., Munari, D., Geroin, C., Ianes, P., Waldner, A., and Gandolfi, M. (2010). Rehabilitation procedures in the management of spasticity. *Eur J Phys Rehabil Med* 46, 423-438.
- Smethurst, P., Newcombe, J., Troakes, C., Simone, R., Chen, Y.R., Patani, R., and Sidle, K. (2016). In vitro prion-like behaviour of TDP-43 in ALS. *Neurobiol Dis* 96, 236-247.
- Smith, B.N., Ticozzi, N., Fallini, C., Gkazi, A.S., Topp, S., Kenna, K.P., Scotter, E.L., Kost, J., Keagle, P., Miller, J.W., *et al.* (2014). Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS. *Neuron* 84, 324-331.
- Smith, C.C., Paton, J.F.R., Chakrabarty, S., and Ichiyama, R.M. (2017a). Descending Systems Direct Development of Key Spinal Motor Circuits. *J Neurosci* 37, 6372-6387.
- Smith, E.F., Shaw, P.J., and De Vos, K.J. (2017b). The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*.
- Sofic, E., Riederer, P., Gsell, W., Gavranovic, M., Schmidtke, A., and Jellinger, K. (1991). Biogenic amines and metabolites in spinal cord of patients with Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect 3*, 133-142.
- Sorenson, E.J., Windbank, A.J., Mandrekar, J.N., Bamlet, W.R., Appel, S.H., Armon, C., Barkhaus, P.E., Bosch, P., Boylan, K., David, W.S., *et al.* (2008). Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. *Neurology* 71, 1770-1775.
- Spataro, R., Bono, V., Marchese, S., and La Bella, V. (2012). Tracheostomy mechanical ventilation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: clinical features and survival analysis. *J Neurol Sci* 323, 66-70.
- Staff, N.P., Madigan, N.N., Morris, J., Jentoft, M., Sorenson, E.J., Butler, G., Gastineau, D., Dietz, A., and Windebank, A.J. (2016). Safety of intrathecal autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells in patients with ALS. *Neurology* 87, 2230-2234.
- Stallings, N.R., Puttaparthi, K., Dowling, K.J., Luther, C.M., Burns, D.K., Davis, K., and Elliott, J.L. (2013). TDP-43, an ALS linked protein, regulates fat deposition and glucose homeostasis. *PLoS One* 8, e71793.
- Stallings, N.R., Puttaparthi, K., Luther, C.M., Burns, D.K., and Elliott, J.L. (2010). Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiol Dis* 40, 404-414.
- Starkey, M.L., Barritt, A.W., Yip, P.K., Davies, M., Hamers, F.P., McMahon, S.B., and Bradbury, E.J. (2005). Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice. *Exp Neurol* 195, 524-539.
- Stephens, B., Guiloff, R.J., Navarrete, R., Newman, P., Nikhar, N., and Lewis, P. (2006). Widespread loss of neuronal populations in the spinal ventral horn in sporadic motor neuron disease. A morphometric study. *J Neurol Sci* 244, 41-58.
- Stephens, B., Navarrete, R., and Guiloff, R.J. (2001). Ubiquitin immunoreactivity in presumed spinal interneurons in motor neurone disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 27, 352-361.

- Stoica, R., De Vos, K.J., Paillusson, S., Mueller, S., Sancho, R.M., Lau, K.F., Vizcay-Barrena, G., Lin, W.L., Xu, Y.F., Lewis, J., *et al.* (2014). ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat Commun* 5, 3996.
- Stoica, R., Paillusson, S., Gomez-Suaga, P., Mitchell, J.C., Lau, D.H., Gray, E.H., Sancho, R.M., Vizcay-Barrena, G., De Vos, K.J., Shaw, C.E., *et al.* (2016). ALS/FTD-associated FUS activates GSK-3beta to disrupt the VAPB-PTPIP51 interaction and ER-mitochondria associations. *EMBO Rep* 17, 1326-1342.
- Stopschinski, B.E., and Diamond, M.I. (2017). The prion model for progression and diversity of neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 16, 323-332.
- Stribl, C., Samara, A., Trumbach, D., Peis, R., Neumann, M., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hrabe de Angelis, M., Rathkolb, B., Wolf, E., *et al.* (2014). Mitochondrial dysfunction and decrease in body weight of a transgenic knock-in mouse model for TDP-43. *J Biol Chem* 289, 10769-10784.
- Strominger, N.L., Truscott, T.C., Miller, R.A., and Royce, G.J. (1979). An autoradiographic study of the rubroolivary tract in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 183, 33-45.
- Strommen, J.A. (2013). Management of spasticity from spinal cord dysfunction. *Neurol Clin* 31, 269-286.
- Suarez, C., Diaz, C., Tolivia, J., Alvarez, J.C., Gonzalez del Rey, C., and Navarro, A. (1997). Morphometric analysis of the human vestibular nuclei. *Anat Rec* 247, 271-288.
- Sun, K., Westholm, J.O., Tsurudome, K., Hagen, J.W., Lu, Y., Kohwi, M., Betel, D., Gao, F.B., Haghghi, A.P., Doe, C.Q., *et al.* (2012). Neurophysiological defects and neuronal gene deregulation in *Drosophila* mir-124 mutants. *PLoS Genet* 8, e1002515.
- Sutedja, N.A., Veldink, J.H., Fischer, K., Kromhout, H., Heederik, D., Huisman, M.H., Wokke, J.H., and van den Berg, L.H. (2009). Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Amyotroph Lateral Scler* 10, 302-309.
- Swarup, V., Phaneuf, D., Bareil, C., Robertson, J., Rouleau, G.A., Kriz, J., and Julien, J.P. (2011). Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain* 134, 2610-2626.
- Swash, M. (2012). Why are upper motor neuron signs difficult to elicit in amyotrophic lateral sclerosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83, 659-662.
- Swinnen, B., and Robberecht, W. (2014). The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10, 661-670.
- Sykova, E., Rychmach, P., Drahoradova, I., Konradova, S., Ruzickova, K., Vorisek, I., Forostyak, S., Homola, A., and Bojar, M. (2017). Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. *Cell Transplant* 26, 647-658.
- Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T., and Takayanagi, H. (2015). Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* 163, 975-987.
- Tan, A.M., Chakrabarty, S., Kimura, H., and Martin, J.H. (2012). Selective corticospinal tract injury in the rat induces primary afferent fiber sprouting in the spinal cord and hyperreflexia. *J Neurosci* 32, 12896-12908.
- Tanaka, Y., Yoshikura, N., Harada, N., Yamada, M., Koumura, A., Sakurai, T., Hayashi, Y., Kimura, A., Hozumi, I., and Inuzuka, T. (2012). Late-onset patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Japan have a higher progression rate of ALSFRS-R at the time of diagnosis. *Intern Med* 51, 579-584.

- Tantirigama, M.L., Oswald, M.J., Clare, A.J., Wicky, H.E., Day, R.C., Hughes, S.M., and Empson, R.M. (2016). Fezf2 expression in layer 5 projection neurons of mature mouse motor cortex. *J Comp Neurol* 524, 829-845.
- Taylor, C.S., and Gross, C.G. (2003). Twitches versus movements: a story of motor cortex. *Neuroscientist* 9, 332-342.
- Taylor, J.P., Brown, R.H., Jr., and Cleveland, D.W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 539, 197-206.
- ten Donkelaar, H.J. (1988). Evolution of the red nucleus and rubrospinal tract. *Behavioural Brain Research* 28, 9-20.
- Teuber, H.L. (1972). Unity and diversity of frontal lobe functions. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 32, 615-656.
- Thibaut, A., Chatelle, C., Ziegler, E., Bruno, M.A., Laureys, S., and Gosseries, O. (2013). Spasticity after stroke: physiology, assessment and treatment. *Brain Inj* 27, 1093-1105.
- Thomsen, G.M., Gowing, G., Latter, J., Chen, M., Vit, J.P., Staggenborg, K., Avalos, P., Alkaslasi, M., Ferraiuolo, L., Likhite, S., *et al.* (2014). Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci* 34, 15587-15600.
- Tigges, J., and Tigges, M. (1981). Distribution of retinofugal and corticofugal axon terminals in the superior colliculus of squirrel monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20, 149-158.
- Tobisawa, S., Hozumi, Y., Arawaka, S., Koyama, S., Wada, M., Nagai, M., Aoki, M., Itoyama, Y., Goto, K., and Kato, T. (2003). Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303, 496-503.
- Toda, T., Ishida, K., Kiyama, H., Yamashita, T., and Lee, S. (2014). Down-regulation of KCC2 expression and phosphorylation in motoneurons, and increases the number of in primary afferent projections to motoneurons in mice with post-stroke spasticity. *PLoS One* 9, e114328.
- Tran, H., Almeida, S., Moore, J., Gendron, T.F., Chalasan, U., Lu, Y., Du, X., Nickerson, J.A., Petrucelli, L., Weng, Z., *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.
- Trompetto, C., Marinelli, L., Mori, L., Cossu, E., Zilioli, R., Simonini, M., Abbruzzese, G., and Baratto, L. (2013). Postactivation depression changes after robotic-assisted gait training in hemiplegic stroke patients. *Gait Posture* 38, 729-733.
- Trompetto, C., Marinelli, L., Mori, L., Pelosin, E., Curra, A., Molfetta, L., and Abbruzzese, G. (2014). Pathophysiology of spasticity: implications for neurorehabilitation. *Biomed Res Int* 2014, 354906.
- Troost, D., Sillevs Smitt, P.A., de Jong, J.M., and Swaab, D.F. (1992). Neurofilament and glial alterations in the cerebral cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 84, 664-673.
- Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N.C., Brown, R.H., Jr., and Hediger, M.A. (1999). SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 2, 848.
- Tseng, T.C., and Wang, S.C. (1971). Locus of action of centrally acting muscle relaxants, diazepam and tybamate. *J Pharmacol Exp Ther* 178, 350-360.

- Tsuchiya, K., Ikeda, K., Mimura, M., Takahashi, M., Miyazaki, H., Anno, M., Shiotsu, H., Akabane, H., Niizato, K., Uchihara, T., *et al.* (2002). Constant involvement of the Betz cells and pyramidal tract in amyotrophic lateral sclerosis with dementia: a clinicopathological study of eight autopsy cases. *Acta Neuropathol* *104*, 249-259.
- Tsuda, H., Han, S.M., Yang, Y., Tong, C., Lin, Y.Q., Mohan, K., Haueter, C., Zoghbi, A., Harati, Y., Kwan, J., *et al.* (2008). The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein VAPB is cleaved, secreted, and acts as a ligand for Eph receptors. *Cell* *133*, 963-977.
- Tudor, E.L., Galtrey, C.M., Perkinson, M.S., Lau, K.F., De Vos, K.J., Mitchell, J.C., Ackerley, S., Hortobagyi, T., Vamos, E., Leigh, P.N., *et al.* (2010). Amyotrophic lateral sclerosis mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein-B transgenic mice develop TAR-DNA-binding protein-43 pathology. *Neuroscience* *167*, 774-785.
- Turner, B.J., Ackerley, S., Davies, K.E., and Talbot, K. (2010a). Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. *Hum Mol Genet* *19*, 815-824.
- Turner, B.J., Lopes, E.C., and Cheema, S.S. (2003). Neuromuscular accumulation of mutant superoxide dismutase 1 aggregates in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* *350*, 132-136.
- Turner, B.J., and Talbot, K. (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* *85*, 94-134.
- Turner, M.R., and Benatar, M. (2015). Ensuring continued progress in biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* *51*, 14-18.
- Turner, M.R., Bowser, R., Bruijn, L., Dupuis, L., Ludolph, A., McGrath, M., Manfredi, G., Maragakis, N., Miller, R.G., Pullman, S.L., *et al.* (2013). Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* *14 Suppl 1*, 19-32.
- Turner, M.R., Cagnin, A., Turkheimer, F.E., Miller, C.C., Shaw, C.E., Brooks, D.J., Leigh, P.N., and Banati, R.B. (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* *15*, 601-609.
- Turner, M.R., Hammers, A., Allsop, J., Al-Chalabi, A., Shaw, C.E., Brooks, D.J., Leigh, P.N., and Andersen, P.M. (2007). Volumetric cortical loss in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* *8*, 343-347.
- Turner, M.R., and Kiernan, M.C. (2012). Does interneuronal dysfunction contribute to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis? *Amyotroph Lateral Scler* *13*, 245-250.
- Turner, M.R., Kiernan, M.C., Leigh, P.N., and Talbot, K. (2009). Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology* *8*, 94-109.
- Turner, M.R., Rabiner, E.A., Hammers, A., Al-Chalabi, A., Grasby, P.M., Shaw, C.E., Brooks, D.J., and Leigh, P.N. (2005). [<sup>11</sup>C]-WAY100635 PET demonstrates marked 5-HT<sub>1A</sub> receptor changes in sporadic ALS. *Brain* *128*, 896-905.
- Turner, M.R., Scaber, J., Goodfellow, J.A., Lord, M.E., Marsden, R., and Talbot, K. (2010b). The diagnostic pathway and prognosis in bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* *294*, 81-85.
- Uematsu, J., Ono, K., Yamano, T., and Shimada, M. (1996a). Development of corticospinal tract fibers and their plasticity I: quantitative analysis of the developing corticospinal tract in mice. *Brain Dev* *18*, 29-34.



- Uematsu, J., Ono, K., Yamano, T., and Shimada, M. (1996b). Development of corticospinal tract fibers and their plasticity. II. Neonatal unilateral cortical damage and subsequent development of the corticospinal tract in mice. *Brain Dev* *18*, 173-178.
- Umeda, T., Takahashi, M., Isa, K., and Isa, T. (2010). Formation of descending pathways mediating cortical command to forelimb motoneurons in neonatally hemidecorticated rats. *J Neurophysiol* *104*, 1707-1716.
- Unrath, A., Ludolph, A.C., and Kassubek, J. (2007). Brain metabolites in definite amyotrophic lateral sclerosis. A longitudinal proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Neurol* *254*, 1099-1106.
- Urbani, A., and Belluzzi, O. (2000). Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *European Journal of Neuroscience* *12*, 3567-3574.
- Urushitani, M., Kurisu, J., Tsukita, K., and Takahashi, R. (2002). Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry* *83*, 1030-1042.
- Vaisman, N., Lusaus, M., Nefussy, B., Niv, E., Comaneshter, D., Hallack, R., and Drory, V.E. (2009). Do patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have increased energy needs? *J Neurol Sci* *279*, 26-29.
- Vajda, A., McLaughlin, R.L., Heverin, M., Thorpe, O., Abrahams, S., Al-Chalabi, A., and Hardiman, O. (2017). Genetic testing in ALS: A survey of current practices. *Neurology* *88*, 991-999.
- Van Damme, P., Bogaert, E., Dewil, M., Hersmus, N., Kiraly, D., Scheveneels, W., Bockx, I., Braeken, D., Verpoorten, N., Verhoeven, K., *et al.* (2007). Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 14825-14830.
- Van Damme, P., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Dis Model Mech* *10*, 537-549.
- Van Deerlin, V.M., Leverenz, J.B., Bekris, L.M., Bird, T.D., Yuan, W., Elman, L.B., Clay, D., Wood, E.M., Chen-Plotkin, A.S., Martinez-Lage, M., *et al.* (2008). TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *The Lancet Neurology* *7*, 409-416.
- Van den Bos, M.A.J., Higashihara, M., Geevasinga, N., Menon, P., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2018). Imbalance of cortical facilitatory and inhibitory circuits underlies hyperexcitability in ALS. *Neurology* *91*, e1669-e1676.
- van Es, M.A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R.J., Veldink, J.H., and van den Berg, L.H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* *390*, 2084-2098.
- Van Hoecke, A., Schoonaert, L., Lemmens, R., Timmers, M., Staats, K.A., Laird, A.S., Peeters, E., Philips, T., Goris, A., Dubois, B., *et al.* (2012). EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. *Nat Med* *18*, 1418-1422.
- Van Laere, K., Vanhee, A., Verschueren, J., De Coster, L., Driesen, A., Dupont, P., Robberecht, W., and Van Damme, P. (2014). Value of 18fluorodeoxyglucose-positron-emission tomography in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *JAMA Neurol* *71*, 553-561.
- 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.

- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., *et al.* (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* *323*, 1208-1211.
- Vandoorne, T., De Bock, K., and Van Den Bosch, L. (2018). Energy metabolism in ALS: an underappreciated opportunity? *Acta Neuropathol* *135*, 489-509.
- Vercruyse, P., Sinniger, J., El Oussini, H., Scekcic-Zahirovic, J., Dieterle, S., Dengler, R., Meyer, T., Zierz, S., Kassubek, J., Fischer, W., *et al.* (2016). Alterations in the hypothalamic melanocortin pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* *139*, 1106-1122.
- Vercruyse, P., Vieau, D., Blum, D., Petersen, A., and Dupuis, L. (2018). Hypothalamic Alterations in Neurodegenerative Diseases and Their Relation to Abnormal Energy Metabolism. *Front Mol Neurosci* *11*, 2.
- Verde, F., Del Tredici, K., Braak, H., and Ludolph, A. (2017). The multisystem degeneration amyotrophic lateral sclerosis - neuropathological staging and clinical translation. *Arch Ital Biol* *155*, 118-130.
- Vergouts, M., Marinangeli, C., Ingelbrecht, C., Genard, G., Schakman, O., Sternotte, A., Calas, A.G., and Hermans, E. (2015). Early ALS-type gait abnormalities in AMP-dependent protein kinase-deficient mice suggest a role for this metabolic sensor in early stages of the disease. *Metab Brain Dis* *30*, 1369-1377.
- Verhaart, W.J. (1962). The red nucleus, the cerebellum and the inferior olive in man. *Acta Neurol Scand* *38*, 67-78.
- Verstraete, E., Polders, D.L., Mandl, R.C., Van Den Heuvel, M.P., Veldink, J.H., Luijten, P., Van Den Berg, L.H., and Hoogduin, J. (2014a). Multimodal tract-based analysis in ALS patients at 7T: a specific white matter profile? *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* *15*, 84-92.
- Verstraete, E., Veldink, J.H., Hendrikse, J., Schelhaas, H.J., van den Heuvel, M.P., and van den Berg, L.H. (2012). Structural MRI reveals cortical thinning in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *83*, 383-388.
- Verstraete, E., Veldink, J.H., Mandl, R.C., van den Berg, L.H., and van den Heuvel, M.P. (2011). Impaired structural motor connectome in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* *6*, e24239.
- Verstraete, E., Veldink, J.H., van den Berg, L.H., and van den Heuvel, M.P. (2014b). Structural brain network imaging shows expanding disconnection of the motor system in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Brain Mapp* *35*, 1351-1361.
- Veyrat-Durebex, C., Corcia, P., Dangoumau, A., Laumonnier, F., Piver, E., Gordon, P.H., Andres, C.R., Vourc'h, P., and Blasco, H. (2014). Advances in cellular models to explore the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol* *49*, 966-983.
- Vielhaber, S., Kunz, D., Winkler, K., Wiedemann, F.R., Kirches, E., Feistner, H., Heinze, H.J., Elger, C.E., Schubert, W., and Kunz, W.S. (2000). Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* *123* ( Pt 7), 1339-1348.
- Vielhaber, S., Winkler, K., Kirches, E., Kunz, D., Büchner, M., Feistner, H., Elger, C.E., Ludolph, A.C., Riepe, M.W., and Kunz, W.S. (1999). Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* *169*, 133-139.
- Voerman, G.E., Gregorič, M., and Hermens, H.J. (2009). Neurophysiological methods for the assessment of spasticity: The Hoffmann reflex, the tendon reflex, and the stretch reflex. *Disability and Rehabilitation* *27*, 33-68.

- Volk, A.E., Weishaupt, J.H., Andersen, P.M., Ludolph, A.C., and Kubisch, C. (2018). Current knowledge and recent insights into the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Med Genet* 30, 252-258.
- von Cramon, D., and Jurgens, U. (1983). The anterior cingulate cortex and the phonatory control in monkey and man. *Neurosci Biobehav Rev* 7, 423-425.
- Vucic, S., Howells, J., Trevillion, L., and Kiernan, M.C. (2006). Assessment of cortical excitability using threshold tracking techniques. *Muscle Nerve* 33, 477-486.
- Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2006). Novel threshold tracking techniques suggest that cortical hyperexcitability is an early feature of motor neuron disease. *Brain* 129, 2436-2446.
- Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2008). Cortical excitability testing distinguishes Kennedy's disease from amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* 119, 1088-1096.
- Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2017). Transcranial Magnetic Stimulation for the Assessment of Neurodegenerative Disease. *Neurotherapeutics* 14, 91-106.
- Vucic, S., Nicholson, G.A., and Kiernan, M.C. (2008). Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131, 1540-1550.
- Vucic, S., and Rutkove, S.B. (2018). Neurophysiological biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol* 31, 640-647.
- Vucic, S., Ziemann, U., Eisen, A., Hallett, M., and Kiernan, M.C. (2013). Transcranial magnetic stimulation and amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiological insights. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84, 1161-1170.
- Wagle-Shukla, A., Ni, Z., Gunraj, C.A., Bahl, N., and Chen, R. (2009). Effects of short interval intracortical inhibition and intracortical facilitation on short interval intracortical facilitation in human primary motor cortex. *J Physiol* 587, 5665-5678.
- Wainger, B.J., Kiskinis, E., Mellin, C., Wiskow, O., Han, S.S., Sandoe, J., Perez, N.P., Williams, L.A., Lee, S., Boulting, G., *et al.* (2014). Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep* 7, 1-11.
- Walker, A.K., Soo, K.Y., Sundaramoorthy, V., Parakh, S., Ma, Y., Farg, M.A., Wallace, R.H., Crouch, P.J., Turner, B.J., Horne, M.K., *et al.* (2013). ALS-associated TDP-43 induces endoplasmic reticulum stress, which drives cytoplasmic TDP-43 accumulation and stress granule formation. *PLoS One* 8, e81170.
- Walker, C., Herranz-Martin, S., Karyka, E., Liao, C., Lewis, K., Elsayed, W., Lukashchuk, V., Chiang, S.C., Ray, S., Mulcahy, P.J., *et al.* (2017). C9orf72 expansion disrupts ATM-mediated chromosomal break repair. *Nat Neurosci* 20, 1225-1235.
- Wang, L., Gutmann, D.H., and Roos, R.P. (2011). Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Hum Mol Genet* 20, 286-293.
- Wang, S.J., Wang, K.Y., and Wang, W.C. (2004). Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* 125, 191-201.
- Wang, W., Li, L., Lin, W.L., Dickson, D.W., Petrucelli, L., Zhang, T., and Wang, X. (2013). The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum Mol Genet* 22, 4706-4719.

- Wargon, I., Lamy, J.C., Baret, M., Ghanim, Z., Aymard, C., Penicaud, A., and Katz, R. (2006). The disynaptic group I inhibition between wrist flexor and extensor muscles revisited in humans. *Exp Brain Res* 168, 203-217.
- Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V.C., Price, D.L., Wong, P.C., and Rothstein, J.D. (2001). Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 8, 933-941.
- Watanabe, T. (2004). The Role of Therapy in Spasticity Management. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* 83, S45-S49.
- Weber, M., Eisen, A., Stewart, H., and Hirota, N. (2000). The split hand in ALS has a cortical basis. *Journal of the Neurological Sciences* 180, 66-70.
- Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N.J., Miller, T.M., and Baloh, R.H. (2009). TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18809-18814.
- Weis, J., Katona, I., Muller-Newen, G., Sommer, C., Necula, G., Hendrich, C., Ludolph, A.C., and Sperfeld, A.D. (2011). Small-fiber neuropathy in patients with ALS. *Neurology* 76, 2024-2029.
- Welniarz, Q., Dusart, I., and Roze, E. (2017). The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders. *Dev Neurobiol* 77, 810-829.
- Wen, T.C., Lall, S., Pagnotta, C., Markward, J., Gupta, D., Ratnadurai-Giridharan, S., Bucci, J., Greenwald, L., Klugman, M., Hill, N.J., *et al.* (2018). Plasticity in One Hemisphere, Control From Two: Adaptation in Descending Motor Pathways After Unilateral Corticospinal Injury in Neonatal Rats. *Front Neural Circuits* 12, 28.
- Wiedemann, F.R., Manfredi, G., Mawrin, C., Beal, M.F., and Schon, E.A. (2002). Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *Journal of Neurochemistry* 80, 616-625.
- Wiedemann, F.R., Winkler, K., Kuznetsov, A.V., Bartels, C., Vielhaber, S., Feistner, H., and Kunz, W.S. (1998). Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 156, 65-72.
- Wiegert, J.S., Mahn, M., Prigge, M., Printz, Y., and Yizhar, O. (2017). Silencing Neurons: Tools, Applications, and Experimental Constraints. *Neuron* 95, 504-529.
- Wijesekera, L.C., and Leigh, P.N. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 4, 3.
- Williams, K.L., Fifita, J.A., Vucic, S., Durnall, J.C., Kiernan, M.C., Blair, I.P., and Nicholson, G.A. (2013). Pathophysiological insights into ALS with C9ORF72 expansions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84, 931-935.
- Williams, T.L., Day, N.C., Ince, P.G., Kamboj, R.K., and Shaw, P.J. (1997). Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 42, 200-207.
- Williamson, T.L., Bruijn, L.I., Zhu, Q., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Julien, J.P., and Cleveland, D.W. (1998). Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9631-9636.
- Williamson, T.L., and Cleveland, D.W. (1999). Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2, 50-56.

- Wils, H., Kleinberger, G., Janssens, J., Pereson, S., Joris, G., Cuijt, I., Smits, V., Ceuterick-de Groote, C., Van Broeckhoven, C., and Kumar-Singh, S. (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.
- Wilson, L.R., Gandevia, S.C., Inglis, J.T., Gracies, J., and Burke, D. (1999a). Muscle spindle activity in the affected upper limb after a unilateral stroke. *Brain* *122 ( Pt 11)*, 2079-2088.
- Wilson, L.R., Gracies, J.-M., Burke, D., and Gandevia, S.C. (1999b). Evidence for fusimotor drive in stroke patients based on muscle spindle thixotropy. *Neuroscience Letters* *264*, 109-112.
- Wirth, B. (2000). An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* *15*, 228-237.
- Wong, M., and Martin, L.J. (2010). Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet* *19*, 2284-2302.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* *14*, 1105-1116.
- Wood, M.J.A., Talbot, K., and Bowerman, M. (2017). Spinal muscular atrophy: antisense oligonucleotide therapy opens the door to an integrated therapeutic landscape. *Hum Mol Genet* *26*, R151-R159.
- Wood, S.J., and R. Slater, C. (2001). Safety factor at the neuromuscular junction. *Progress in Neurobiology* *64*, 393-429.
- Wootz, H., Fitzsimons-Kantamneni, E., Larhammar, M., Rotterman, T.M., Enjin, A., Patra, K., Andre, E., Van Zundert, B., Kullander, K., and Alvarez, F.J. (2013). Alterations in the motor neuron-rensaw cell circuit in the Sod1(G93A) mouse model. *J Comp Neurol* *521*, 1449-1469.
- Worms, P.M. (2001). The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *Journal of the Neurological Sciences* *191*, 3-9.
- Wu, C.H., Fallini, C., Ticozzi, N., Keagle, P.J., Sapp, P.C., Piotrowska, K., Lowe, P., Koppers, M., McKenna-Yasek, D., Baron, D.M., *et al.* (2012). Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* *488*, 499-503.
- Xiao, Y., Karam, C., Yi, J., Zhang, L., Li, X., Yoon, D., Wang, H., Dhakal, K., Ramlow, P., Yu, T., *et al.* (2018). ROS-related mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of an ALS mouse model during the disease progression. *Pharmacol Res* *138*, 25-36.
- Xu, Y.F., Gendron, T.F., Zhang, Y.J., Lin, W.L., D'Alton, S., Sheng, H., Casey, M.C., Tong, J., Knight, J., Yu, X., *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.
- Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E.A., Garcia, M.L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O.R., Cleveland, D.W., and Goldstein, L.S. (2008a). Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 7594-7599.
- Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., and Cleveland, D.W. (2008b). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* *11*, 251-253.

- Yang, C., Danielson, E.W., Qiao, T., Metterville, J., Brown, R.H., Jr., Landers, J.E., and Xu, Z. (2016). Mutant PFN1 causes ALS phenotypes and progressive motor neuron degeneration in mice by a gain of toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, E6209-E6218.
- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H.X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W.Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A.C., *et al.* (2001). The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* *29*, 160-165.
- Yasuda, K., Zhang, H., Loisel, D., Haystead, T., Macara, I.G., and Mili, S. (2013). The RNA-binding protein Fus directs translation of localized mRNAs in APC-RNP granules. *J Cell Biol* *203*, 737-746.
- Yasvoina, M.V., Genc, B., Jara, J.H., Sheets, P.L., Quinlan, K.A., Milosevic, A., Shepherd, G.M., Heckman, C.J., and Ozdinler, P.H. (2013). eGFP expression under UCHL1 promoter genetically labels corticospinal motor neurons and a subpopulation of degeneration-resistant spinal motor neurons in an ALS mouse model. *J Neurosci* *33*, 7890-7904.
- Z'Graggen, W.J., Fouad, K., Raineteau, O., Metz, G.A.S., Schwab, M.E., and Kartje, G.L. (2000). Compensatory Sprouting and Impulse Rerouting after Unilateral Pyramidal Tract Lesion in Neonatal Rats. *The Journal of Neuroscience* *20*, 6561-6569.
- Z'Graggen, W.J., Metz, G.A.S., Kartje, G.L., Thallmair, M., and Schwab, M.E. (1998). Functional Recovery and Enhanced Corticofugal Plasticity after Unilateral Pyramidal Tract Lesion and Blockade of Myelin-Associated Neurite Growth Inhibitors in Adult Rats. *The Journal of Neuroscience* *18*, 4744-4757.
- Zang, D.W., and Cheema, S.S. (2002). Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1G93A G1H transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* *332*, 99-102.
- Zhang, B., Tu, P., Abtahian, F., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1997). Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J Cell Biol* *139*, 1307-1315.
- Zhang, K., Donnelly, C.J., Haeusler, A.R., Grima, J.C., Machamer, J.B., Steinwald, P., Daley, E.L., Miller, S.J., Cunningham, K.M., Vidensky, S., *et al.* (2015). The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* *525*, 56-61.
- Zhang, Q., Mao, C., Jin, J., Niu, C., Bai, L., Dang, J., and Zhang, M. (2014a). Side of limb-onset predicts laterality of gray matter loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int* *2014*, 473250.
- Zhang, R., Gascon, R., Miller, R.G., Gelinas, D.F., Mass, J., Hadlock, K., Jin, X., Reis, J., Narvaez, A., and McGrath, M.S. (2005). Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J Neuroimmunol* *159*, 215-224.
- Zhang, R., Hadlock, K.G., Do, H., Yu, S., Honrada, R., Champion, S., Forshew, D., Madison, C., Katz, J., Miller, R.G., *et al.* (2011). Gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J Neuroimmunol* *230*, 114-123.
- Zhang, W., Zhang, L., Liang, B., Schroeder, D., Zhang, Z.W., Cox, G.A., Li, Y., and Lin, D.T. (2016). Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci* *19*, 557-559.
- Zhang, Y.J., Jansen-West, K., Xu, Y.F., Gendron, T.F., Bieniek, K.F., Lin, W.L., Sasaguri, H., Caulfield, T., Hubbard, J., Daugherty, L., *et al.* (2014b). Aggregation-prone c9FTD/ALS poly(GA) RAN-translated proteins cause neurotoxicity by inducing ER stress. *Acta Neuropathol* *128*, 505-524.

- Zhang, Z., Almeida, S., Lu, Y., Nishimura, A.L., Peng, L., Sun, D., Wu, B., Karydas, A.M., Tartaglia, M.C., Fong, J.C., *et al.* (2013). Downregulation of microRNA-9 in iPSC-derived neurons of FTD/ALS patients with TDP-43 mutations. *PLoS One* 8, e76055.
- Zhao, F., Li, P., Chen, S.R., Louis, C.F., and Fruen, B.R. (2001). Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J Biol Chem* 276, 13810-13816.
- Zoccolella, S., Beghi, E., Palagano, G., Fraddosio, A., Guerra, V., Samarelli, V., Lepore, V., Simone, I.L., Lamberti, P., Serlenga, L., *et al.* (2007). Riluzole and amyotrophic lateral sclerosis survival: a population-based study in southern Italy. *Eur J Neurol* 14, 262-268.
- Zoccolella, S., Beghi, E., Palagano, G., Fraddosio, A., Guerra, V., Samarelli, V., Lepore, V., Simone, I.L., Lamberti, P., Serlenga, L., *et al.* (2008). Analysis of survival and prognostic factors in amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79, 33-37.
- Zona, C., Siniscalchi, A., Mercuri, N.B., and Bernardi, G. (1998). Riluzole interacts with voltage-activated sodium and potassium currents in cultured rat cortical neurons. *Neuroscience* 85, 931-938.
- 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 Psychiatry* 88, 540-549.
- Zurcher, N.R., Loggia, M.L., Lawson, R., Chonde, D.B., Izquierdo-Garcia, D., Yasek, J.E., Akeju, O., Catana, C., Rosen, B.R., Cudkowicz, M.E., *et al.* (2015). Increased in vivo glial activation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: assessed with [(11)C]-PBR28. *Neuroimage Clin* 7, 409-414.

# ANNEXES



# Annexe 1 : Liste des publications et communications

## Liste des publications

### Publiée :

Age-related vulnerability of pattern separation in C57BL/6J mice. Cès A, Burg T, Herbeaux K, Héraud C, Bott JB, Mensah-Nyagan AG, Mathis C. Neurobiol Aging. 2018. 62:120-129.

### Soumise :

Early alterations of RNAmetabolism and splicing from adult corticospinal neurons in an ALS mouse model. Marques C, Fischer M, Keime C, Burg T, Brunet A, Scekic-Zahirovic J, Rouaux C. Soumis à Nature Neurosciences, 2019.

### En préparation :

Absence of corticospinal neurons delays disease onset in a mouse model of ALS. Burg T, Bichara C, Scekic-Zahirovic J, Fischer F, Stuart-Lopez G, Lefevbre F, Cordero-Erausquin M, Rouaux C. 2019.

## Liste des communications orales et affichées

**Finale régionale « Ma thèse en 180 secondes »** à Strasbourg, France, 2016. Burg T. Régénération des neurones moteurs supérieurs par différenciation dirigées de cellules souches neurales adultes dans un modèle murin de SLA : vers de nouvelles approches thérapeutiques - **ORAL**

**Congrès “Eurogenesis”** à Bordeaux, France, 2016. Burg T et Rouaux C. The adult subventricular zone as a source of neuronal regeneration in a mouse model of ALS - **POSTER**

**2<sup>èmes</sup> journées de la recherche sur la SLA et les maladies du neurone moteur** à Paris, France, 2016. Burg T et Rouaux C. La zone sous-ventriculaire en qualité de source potentielle de régénération neuronale dans un modèle murin de SLA - **POSTER**

**3<sup>èmes</sup> journées de la recherche sur la SLA et les maladies du neurone moteur** à Paris, France, 2017. Burg T, Fischer M et Rouaux C. Détermination du rôle des neurones moteurs corticospinaux dans le déclenchement et la progression de la SLA - **POSTER**

**Journée de l’Ecole Doctorale 414** à Strasbourg, France, 2018. Burg T, Fischer M et Rouaux C. Determination of the role of Cortico-Spinal Motor Neurons in ALS - **ORAL**

**Congrès “European Network to cure ALS”** à Oxford, Angleterre, 2018. Burg T, Fischer M et Rouaux C. Determination of the role of Cortico-Spinal Motor Neurons in the onset and progression of ALS - **POSTER**

**4<sup>èmes</sup> journées de la recherche sur la SLA et les maladies du neurone moteur** à Paris, France, 2018. Burg T, Fischer M et Rouaux C. Détermination du rôle des neurones moteurs corticospinaux dans le déclenchement et la progression de la SLA - **ORAL**

**First French-German-Swiss meeting on ALS-FTD** à Ulm, Allemagne, 2019. Burg T, Fischer M, Bichara C, Levebre F, Cordero-Erausquin M et Rouaux C. Absence of corticospinal neurons improves motor performances and life expectancy in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS - **ORAL**

**7<sup>èmes</sup> éditions des journées de la FMTS** à Strasbourg, France, 2019. Burg T, Bichara C, Scekcic-Zahirovic J, Fischer M, Stuart-Lopez G, Levebre F, Cordero-Erausquin M et Rouaux C. Détermination du rôle des neurones corticospinaux dans le déclenchement et la progression de la sclérose latérale amyotrophique – **ORAL**

## Annexe 2 : Publication N°1

Cette étude inédite dans un modèle murin de SLA a permis une caractérisation rigoureuse de la dégénérescence des NCS. Les résultats montrent que chez les souris *Sod1*<sup>G86R</sup>, la perte des NCS précède celle des MN, de plus la dégénérescence de ces deux populations neuronales se fait de manière somatotopique et spatiotemporelle. Grâce au développement d'une nouvelle technique permettant la purification sélective des NCS chez des souris adultes, les caractéristiques moléculaires de la dégénérescence des NCS ont pu être mis pour la première fois en évidence. Les analyses transcriptomiques montrent une altération du métabolisme de l'ARN et de l'épissage, un résultat nouveau dans le contexte des mutations *Sod1* et des NCS. Dans cette publication, j'ai réalisé toutes les étapes de l'analyse des jonctions neuromusculaires, allant de la dissection aux analyses microscopiques, informatiques et statistiques. J'ai également participé à la relecture du manuscrit.

1 ***Early alterations of RNA metabolism and splicing from adult corticospinal neurons in***  
2 ***an ALS mouse model***

3

4 Christine Marques<sup>1,2</sup>, Mathieu Fischer<sup>1,3</sup>, Céline Keime<sup>4</sup>, Thibaut Burg<sup>1</sup>, Aurore Brunet<sup>1</sup>,  
5 Jelena Scekic-Zahirovic<sup>1</sup> & Caroline Rouaux<sup>1\*</sup>

6

7

8

9 <sup>1</sup>Inserm UMR\_S 1118, Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence,  
10 Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

11 <sup>2</sup>Current address: Department of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA;  
12 Department of Neurology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA.

13 <sup>3</sup>Current address: Department of Paediatrics, John Radcliffe Hospital, University of Oxford,  
14 Oxford, UK.

15 <sup>4</sup>Inserm UMR\_S 1258, CRNS UMR\_S 7104, Université de Strasbourg, IGBMC, Strasbourg,  
16 France.

17

18 \*Correspondence should be addressed to: C.R. ([caroline.rouaux@inserm.fr](mailto:caroline.rouaux@inserm.fr))

## Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease clinically defined as the combined degeneration of corticospinal and corticobulbar neurons (CSN), and bulbar and spinal motor neurons (MN). A growing body of evidence points to the motor cortex, where CSN are located, as the potential initiation site of ALS. However, little is known about the spatiotemporal dynamics of CSN degeneration and the molecular pathways involved. Here, we show in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS that CSN loss precedes MN degeneration and that CSN and MN degenerations are somatotopically related, highlighting the relevance of CSN to ALS onset and progression. To gain insights into the molecular mechanisms that selectively trigger CSN degeneration, we purified CSN from the motor and somatosensory cortex of adult mice and analysed their transcriptome from presymptomatic ages to disease end-stage. Significant RNA metabolism and splicing alterations, novel in the context of *Sod1* mutation, were identified, including mis-splicing events that largely trigger genes involved in neuronal functions. Together, the data indicate that CSN dysfunction and degeneration upon mutant *Sod1* expression involve alterations of RNA metabolism and splicing, emphasizing shared mechanisms across various ALS-related genes.



ALS is an incurable and fatal neurodegenerative disease that mostly starts in adulthood with a rapidly progressing paralysis and death within only 2 to 5 years of diagnosis<sup>1,2</sup>. In clinics, ALS is defined as the combined degeneration of both corticospinal and corticobulbar neurons (CSN, or upper motor neurons) whose cell bodies are located in the cerebral cortex and that extend axons to the medulla and spinal cord, and of spinal and bulbar motor neurons (MN, or lower motor neurons) whose cell bodies are located in the medulla and spinal cord, and that connect to the skeletal muscles. If the cellular and molecular mechanisms behind MN degeneration are relatively well known, the numerous related clinical trials have unfortunately failed to translate into improved treatment of ALS<sup>1-4</sup>, a discrepancy that contributed to the emergence of the CSN and the overall cerebral cortex as alternative therapeutic targets.

A growing body of evidence points to the motor cortex as the likely initiation site of ALS<sup>5,6</sup>. A first series of arguments arose from the recent genetic, pathological and clinical evolution links established between ALS and FrontoTemporal Dementia (FTD), a neurodegenerative disease that affects solely the cerebral cortex and results in behavioural and cognitive deficits<sup>7</sup>. A second series of arguments emerged following extensive examination of the TDP-43 aggregates, a pathological hallmark of the disease in post-mortem brains from ALS patients, identifying the motor cortex as the most affected region of the brain, and leading to the corticofugal hypothesis<sup>8-10</sup> which proposes a sequential pattern of pathology spreading from the motor cortex to its projection sites. Finally, transcranial magnetic stimulation studies of ALS patients revealed typical hyperexcitability of the motor cortex that characterizes both sporadic and familial ALS patients, negatively correlates with survival, and manifests prior to disease onset<sup>11</sup>, further suggesting a primary involvement of the motor cortex in disease initiation. In this context, the CSN, that connect the motor cortex to its downstream targets and degenerate in ALS, appear as potentially very relevant cellular players of disease onset and progression.

So far, only a limited number of studies reported on the degeneration of CSN in mouse models of the disease. Early and progressive loss of CSN was initially demonstrated in the *SOD1<sup>G93A/G1H</sup>* and then the *SOD1<sup>G93A</sup>* mouse lines<sup>12-14</sup>. More recently, loss of CSN has been reported at symptom onset in the *Thy1::TDP43<sup>A315T</sup>* mice<sup>15</sup>. Finally *hPFN1<sup>G118V</sup>* mice<sup>16</sup> and *C9-BAC* mice<sup>17</sup> present respectively a loss of CTIP2-positive neurons or of large pyramidal cells within the layer V of the motor cortex, at disease end-stage. Together, these studies highly suggest that the mouse strains that best mimic ALS symptoms recapitulate CSN degeneration.

Here, we sought to unravel the signalling pathways that accompany CSN initial dysfunction and ultimate loss during the course of the disease, using the *Sod1<sup>G86R</sup>* mice that typically recapitulate ALS onset and progression, with first motor symptoms detected at around 90 days of age and premature death at around 110 days<sup>18,19</sup>. In the absence of specific reporter to label CSN, *i.e.* to discriminate them from the neighbouring and highly similar subcerebral projection neurons that populate the layer V of the motor and non-motor cerebral cortex, we performed series of retrograde labelling of this disease-relevant neuronal population. Rigorous sampling and counting method of CSN highlights their pre-symptomatic and progressive loss, and a somatotopic relationship between CSN and MN degenerations, which had not been previously reported in animal models. After purification of labelled CSN from the motor and somatosensory cortex of adult wild-type or *Sod1<sup>G86R</sup>* at two presymptomatic and two symptomatic ages, we conducted a longitudinal transcriptome analysis of this population under neurodegenerative conditions. We unravelled alterations of expression of genes involved in RNA metabolism, further confirmed by occurrences of RNA mis-splicing. These uncovered signalling pathways are highly reminiscent of those described for other, recently identified ALS-related genes known to regulate RNA metabolism, such as

*FUS* and *TARDBP*<sup>7</sup>, but are novel for *SOD1*, highlighting common, disease-relevant molecular pathways.



## Results

### CSN progressively degenerate in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice

To test whether *Sod1<sup>G86R</sup>* mice recapitulate a progressive loss of CSN, we performed a series of retrograde labelling of the whole CSN population from the cervical portion of the spinal cord of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, by injecting Fluorogold at two presymptomatic ages, 60 days (60d: n=5 WT and 6 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and 75 days (75d: n=6 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*), and two symptomatic ages, 90 days (90d: n=5 WT and 6 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and 105 days (105d: n=5 WT) or end-stage (ES: n=5 *Sod1<sup>G86R</sup>*) (Fig. 1a). Microscopy analysis of coronal sections revealed labelled pyramidal cells in the cerebral cortex, spanning from Bregma 2.10 mm to Bregma -2.30 mm (Supplementary Fig. 1). As exemplified at the rostro-caudal level Bregma 0.74 mm, labelled cells located in cortical layer V span from the secondary motor cortex medially to the primary somatosensory cortex laterally, in both wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* animals (Fig. 1b). We observed a marked decrease of labelled CSN in the cerebral cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice over time (Fig. 1b,c).

To evaluate a potential gradual loss of the whole population of CSN in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, we quantified the number of labelled CSN present in both hemispheres of 8 coronal sections equally spaced along the rostro-caudal axis and matched between the two genotypes (Supplementary Fig. 1). The results show that the population of retrogradely-labelled CSN progressively decreased over time in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals compared to their wild-type littermates (Fig. 1d). This decrease became significant at the symptomatic age of 90 days, and reached a loss of 33.3% by the end of the disease (Fig. 1d).

To confirm these results and exclude the possibility that the loss of CSN could be due to a defective retrograde transport of Fluorogold by the axons of the *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN, we took advantage of the expression of the *mu-Crystallin* gene (*Crym*) by the CSN, along with other subcerebral projection neurons of the cortical layer V<sup>20</sup>. *In situ* hybridization for *Crym*

(Supplementary Fig. 2), was performed at one single rostro-caudal level (Bregma 0,14 mm) and within the layer V of the secondary and primary motor area and the most medial part of the primary sensorimotor areas only, at 60d (n=3 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 90d (n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 105d (n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and 115d/ES (n=3 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*).

Quantification revealed a progressive reduction of *Crym*-positive neurons in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice compared to their wild-type littermates (Supplementary Fig. 2). While the data do not rule out the possibility that retrograde transport may be altered in CSN over time, they nevertheless confirm a progressive loss of the CSN population in *Sod1<sup>G86R</sup>*.

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

In mice, CSN are topographically organized along the rostro-caudal and the medio-lateral axes, and project accordingly to different portions of the spinal cord<sup>21,22</sup>. Sampling the whole population of CSN along the rostro-caudal axis (Supplementary Fig. 1) enabled us to test whether their degeneration was homogeneous, or rather affected more selectively sub-populations. We thus quantified the number of CSN present on each of the 8 selected coronal sections (Fig. 2) of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* brains over time. Using this approach, we observed that the number of CSN was uneven along the rostro-caudal axis, and that CSN were overall more numerous in the most caudal sections (Fig. 2 and Supplementary Fig.1). At the presymptomatic ages 60d and 75d, *Sod1<sup>G86R</sup>* brains displayed less CSN than their wild-type counterparts, at every level analysed, but no significant difference could be detected between the two genotypes (Fig. 2). At 90d, we observed a significant reduction of CSN in the caudal sections only, and this reduction was uneven amongst these sections, with a greater decrease observed at the most caudal levels (section 5: 11,86% loss; 6: 19,23%; 7: 19,21%; 8: 29,59%; 9: 28,43%; Fig. 2). At 105d/ES, with the exception of section 3, the loss of CSN was significant at every level. Within the caudal part, section 9 remained the most severely



affected, with a loss of 44,48%, but overall, the most impacted section was the rostral section 2, with a loss of 68,67% (Fig. 2). Together, the data show that CSN degeneration is not even along the rostro-caudal axis in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice: it starts with the most caudally located ones, and progresses rostrally over time.

### **CSN and MN degenerations are temporally and somatotopically related**

Because CSN that innervate the lumbar spinal cord are mostly caudally located<sup>21,22</sup>, we reasoned that they might account for the majority of the neuronal loss observed in the most caudal sections we analysed. To test this hypothesis, we performed a second set of retrograde labelling and injected Fluorogold from the lumbar portion of the spinal cord of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, at the same presymptomatic ages (60d: n=4 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 75d: n=4 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*) and symptomatic ages (90d: n=5 WT and 5 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 105d: n=4 WT and ES: n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) (Fig. 3a). Microscopy analysis of coronal sections revealed labelled cortical cells, spanning from Bregma -0,46 mm to Bregma -1,70 mm (Supplementary Fig. 3). Each of the three levels considered (section 8, Bregma -1,06 mm, Fig.3, and sections 7 and 9, Bregma -0,46 and -1,70 mm respectively, data not shown), showed a marked loss of CSN from 60 days on (Fig. 3c). Sampling and counting the lumbar-projecting CSN revealed a marked loss of this subpopulation in the *Sod1<sup>G86R</sup>* mice compared to their wild-type littermates, which was significant from 60 days on, and intensified over time (Fig. 3b). Taken together, the data show that, in the *Sod1<sup>G86R</sup>* animals, the loss of lumbar-projecting CSN starts earlier than that of the overall CSN population.

The paralysis that progressively affects the *Sod1<sup>G86R</sup>* mice typically starts in the hind limbs. In accordance with this, spinal motor neurons (MN) were shown to degenerate in the lumbar portion of the spinal cord<sup>18,19</sup>. In order to compare the time course of lumbar-projecting CSN degeneration to that of lumbar MN, we counted the number of ChAT-positive

neurons present in the ventral horn of the lumbar spinal cord of wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> animals over time (60d: n=5 WT and 6 *Sod1*<sup>G86R</sup>; 75d: n=6 WT 3 *Sod1*<sup>G86R</sup>; 90d: n=5 WT and 6 *Sod1*<sup>G86R</sup>; 105d/ES: n=5 WT 5 *Sod1*<sup>G86R</sup>; Fig. 3d,e,f). We failed to detect any significant difference between *Sod1*<sup>G86R</sup> and wild-type mice before end-stage of the disease ( $15,3 \pm 0,3$  vs  $19,3 \pm 0,6$  respectively, corresponding to a loss of 20,7%; Fig. 3e). To exclude the contribution of small, disease-resistant gamma motor neurons and restrict the counting to large, disease-vulnerable alpha motor neurons, we next counted the number of large ( $400\mu\text{m}^2$  or above) ventral ChAT-positive neurons (Fig. 3f). We observed an important and significant loss of large ChAT-positive neurons at end-stage of the disease (65,27%,  $p < 0,001$ ), and a milder and non-significant loss at 90 days of age (19,19%,  $p = 0,237$ ). Together, the data suggest that, in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, actual loss of lumbar MN following the shrinkage of their somas is a rather late event in comparison with the overall disease progression.

In mutant *Sod1* mouse models of ALS, MN undergo Wallerian degeneration, characterized by initial alteration of the neuromuscular junction (NMJ) and retrograde progression to the soma<sup>23</sup>. To determine when lumbar MN degeneration starts, we performed electromyography recordings in the tibialis anterior (Supplementary Fig. 4a,b) muscles of both hind limbs of the *Sod1*<sup>G86R</sup> mice and their control littermates prior to their harvesting. Using this technique, NMJ denervation was evident on 100% of *Sod1*<sup>G86R</sup> end-stage animals, and 66,66% of 90 day-old animals, but not on younger animals (Supplementary Fig. 4a,b). To confirm these results, we investigated the status of the NMJ of the tibialis anterior muscle by immunofluorescence (Supplementary Fig. 4c,d). In both wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> animals we observed healthy, innervated neuromuscular junctions, along with a small proportion of partly denervated NMJ that displayed discrete disconnections of the axonal terminal (Supplementary Fig.4d). The proportion of partly denervated NMJ was stable across ages and genotypes (Supplementary Fig.4c), indicating that their occurrence likely reflects a mild alteration of the



tissue during the process of bundles preparation. Importantly, in *Sod1<sup>G86R</sup>* animals only, we detected fully denervated NMJ that had lost their axonal terminal (Supplementary Fig.4d). This phenotype was present only from 90 days on, and progressed over time (17,7% of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 90 days, 76,9% at end-stage, Supplementary Fig. 4c). Thus, the data indicate that lumbar MN degeneration starts after 75 days of age in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice.

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

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

To investigate the molecular mechanisms behind CSN degeneration, we first developed an approach to purify this neuronal population from the cerebral cortex of adult wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. CSN were retrogradely labelled by injecting green fluorescent microspheres into the cervical portion of the dorsal funiculus at 25 days of age (Fig. 4a,b,c). Animals were harvested at two presymptomatic ages, 30 and 60 days, and two symptomatic ages, 90 and 105 days (Fig. 4b). CSN-containing cortical layers V were then microdissected and labelled CSN were dissociated and purified by FACS (Fig. 4a,c). In parallel, a second population of cortical neurons, the callosal projection neurons (CPN) located in the layers II/III of the cerebral cortex, above the labelled CSN, were also purified (Fig. 4a,c). CPN and CSN are close neuronal populations: they arise from a same pool of cortical progenitors, are excitatory projection neurons that use the glutamate as a neurotransmitter, and express some

common molecular markers. Yet, as opposed to CSN, CPN have not been reported to degenerate in ALS, and may thus represent a valuable control population of cortical excitatory neurons that overexpress the *Sod1<sup>G86R</sup>* transgene without degenerating. To confirm this, we took advantage of *Cux2* selective expression in upper layer CPN<sup>24</sup>, and measured the density of CUX2-positive nuclei in the cortical layers II/III of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* at 60, 75, 90 and 105 days of age or at disease end-stage. No decrease of CUX2-positive nuclei could be detected (Supplementary Fig. 5). Instead, we observed a significant increase of CUX2 density at disease end stage, which could potentially arise from an overall decrease of the cortical thickness. We reasoned that the comparison between the two neuronal populations, vulnerable CSN versus resistant CPN, would enable to distinguish genes dysregulated in CSN only, and likely to be involved in their degeneration, from genes dysregulated in both populations, and unlikely to have any detrimental effect on neuronal survival. Importantly, in most of the cases, CSN and CPN were purified from same animals (Fig. 4a,c). 64 samples were initially sequenced (n=4 biological replicated x 2 genotypes x 2 cell types x 4 ages), 7 were excluded because they did not expressed the expected markers or were altered, and a total of 57 samples were further processed (CSN: 30d: n=4 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 60d: n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 90d: n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 105d: n=4 WT and 2 *Sod1<sup>G86R</sup>*; CPN: 30d: n=4 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 60d: n=2 WT and 3 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 90d: n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*; 105d: n=4 WT and 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*). Unsupervised hierarchical clustering of 45,337 mRNA transcripts in all samples clearly separated the two neuronal populations in distinct clusters (Fig. 4d). qPCR (data not shown) and RNAseq data (Fig. 4e) confirmed that purified CSN expressed markers typical of the cortical layer V subcerebral projection neurons, and did not express any marker typical of upper layer projection neurons<sup>20,24,25</sup>, and vice-versa (Fig. 4e). Together, the data indicate that subtypes of excitatory neuronal populations can be successfully co-purified from individual adult mouse cortices, under healthy or neurodegenerative conditions.



## **RNAseq analysis reveals early, CSN-specific transcriptional alterations in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice**

When performed separately on CSN or CPN samples, PCA globally distinguished the wild-type from the *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN (Fig. 5a, left panel), while no sub-groups were visible amongst the CPN samples (Fig. 5a, right panel). Taking all ages into account, analysis of differential gene expression between wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> samples indicated that numerous genes present a statistically significant differential expression within the CSN samples (Fig. 5b, left panel), as opposed to the CPN samples (Fig. 5a, right panel), in spite of similar strong up-regulation of the *Sod1* mRNA levels in both populations (Fig. 5a,b, inserts). Next, we evaluated age by age, the proportion and significance of differentially expressed genes between wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN samples. As illustrated by the volcano plots (Fig. 5c), the number of genes significantly dysregulated in *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN are more important in symptomatic than in pre-symptomatic ages. Finally, we compared the pools of genes significantly dysregulated between wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN samples, and between wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> CPN samples (Fig. 5d). Venn diagrams at four ages of interest (Fig. 5d) illustrate that important transcriptional dysregulations selectively occurred in CSN. These selective dysregulations started as early as 30 days of age and became more numerous as neurodegeneration progressed. In comparison, CPN transcriptional dysregulations are very modest. Importantly, very few common genes were found between the two neuronal populations. Thus, the data suggest that the two neuronal populations cope differently with the overexpression of the mutant *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene, in accordance with the selective and progressive degeneration of the CSN and the maintenance of the CPN in the *Sod1*<sup>G86R</sup> animals over time.

## Gene set enrichment and network analyses resolve RNA metabolism dysregulation in *Sod1<sup>G86R</sup>* CSN

To identify the molecular pathways that accompany CSN degeneration, we ran a Gene Set Enrichment Analysis<sup>26</sup> (GSEA) on a ranked list of 29, 017 genes significantly and selectively dysregulated in CSN and not in CPN across ages (Fig. 6a, and Supplementary Table 1). As expected in a context of ALS, the first gene ontology (GO) terms for biological processes (BP), cellular components (CC) and molecular functions (MF) were linked to the mitochondria (Fig. 6a, and Supplementary Table 1), indicating that CSN degeneration, like MN degeneration, is accompanied with alteration of the mitochondrial functions. Interestingly, amongst the 24 most up-regulated GO terms for BP, 7 were associated with RNA metabolism and transcriptional initiation: Ribonucleoprotein complex biogenesis and assembly (Normalized Enrichment Score, NES=2.94; Size=66), Protein RNA complex assembly (NES=2.86; Size=51), Translational initiation (NES=2.85; Size=34), RNA processing (NES=2.77; Size=136), tRNA metabolic process (NES=2.75; Size=16), Regulation of Translation Initiation (NES=2.63; Size=27) and RNA splicing (NES=2.62; Size=66) (Fig. 6a, and Supplementary Table 1). This relatively important representation of the GO terms in relation with RNA metabolism was further emphasized on an Enrichment Map for the BP, where the terms in relation with RNA metabolism appeared as part of the first sub-network (Fig. 6b, and Supplementary Fig. 6). In accordance with this, GO for CC indicated up-regulations of the Ribonucleoprotein complex (NES=3.59; Size=117 genes), the Endoplasmic reticulum (NES=3.20; Size=224 genes) and the Spliceosome (NES=2.65; Size=40) (Supplementary Table 1). Similarly, GO for MF indicated up-regulations of the Translation Initiation Factor Activity (NES=2.63; Size=20 genes), the Translation Regulator Activity (NES=2.38; Size=33 genes) and the Translation Factor Activity / Nucleic Acid Binding (NES=2.35; Size=31) (Supplementary Table 1). Expression profiles of some of these



genes involved in RNA metabolism are shown for the pre-symptomatic and symptomatic ages of 30 and 90 days respectively (Fig. 6c). Remarkably, many of these genes are related either to motoneuron diseases such as Hereditary Spastic Paraplegia, Primary Lateral Sclerosis, Charcot-Marie-Tooth Disease, Spinal Muscular Atrophy, or to mental retardation and other related neurodevelopmental diseases, or both (Fig. 6c, asterisks, and Supplementary Table 2). We thus reasoned that some of these transcriptional alterations might occur very early on during the development and specification of the CSN. To test this possibility, we used microfluidics to run high-throughput qPCR validations on two groups of samples: cortical layers V microdissected from the motor cortex of 60 day-old wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> animals, where the contribution of CSN to the overall variety of cell types is modest (Fig. 6d), and cortical plates from embryonic day (E) 14.5 wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> embryos, that are enriched in developing layers V and VI corticofugal neurons and include specifying CSN, and are mostly devoid of other cortical excitatory projection neurons, cortical inhibitory neurons, and glial cell types (Fig. 6e). High-throughput qPCR results indicated that several of the gene expression dysregulations identified in pure adult CSN populations could also be observed in whole adult cortical layer V (Fig. 6d), in spite of the large dilution of the CSN contribution to the overall samples, and to a larger extent in E14.5 cortical plates of *Sod1*<sup>G86R</sup> embryos in comparison with their wild-type littermates (Fig. 6e). Together, the data indicate that CSN degeneration in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice correlates with transcriptional alterations of genes involved in RNA metabolism. Interestingly, part of these transcriptional dysregulations are already present during corticogenesis, suggesting that CSN ultimate degeneration in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS could arise, at least partly, from neurodevelopmental alterations that may affect their proper specification, integration into neuronal circuits and functioning.

### **RNA mis-splicing accompanies CSN degeneration**

The identification of broad transcriptional alterations of genes involved in RNA metabolism, and more particularly in RNA splicing, may translate into altered mRNA splicing profile of the *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN compared to the wild-type CSN population. To test this possibility, we employed rMATS<sup>27</sup> to detect alternative splicing events from the 90 day-old wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN (n=4 per group) and CPN (n=2 WT and 3 *Sod1*<sup>G86R</sup>) replicates (Fig. 7). A total of 1,707 CSN-selective alternative splicing events corresponding to 1,163 affected genes were identified as skipped exons (SE, 722 events, 42.3%), alternative 5' splice sites (A5SS, 241 events, 14.1%), alternative 3' splice sites (A3SS, 334 events, 19.6%), mutually exclusive exons (MXE, 224 events, 13.1%) and retained introns (RI, 186 events, 10.9%) (Fig. 7a). GSEA analysis ran on the affected genes revealed the overrepresentation of GO terms for biological processes related to Neuronal Differentiation, Synaptic Signalling and Neuronal Death (7 out of 20 significant GO terms) (Fig. 7b and Supplementary Table 3). Sashimi plots are shown for selected neuronal genes *Dynamin 1 (Dnm1)*, *Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein (Picalm)*, *Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 9A (Ppp1r9a)*, *EFR3 homolog A (Efr3a)*, *Very Low Density Lipoprotein Receptor (Vldlr)* and *Microtubule-Actin Crosslinking Factor 1 (Macf1)* (Fig. 7c). Interestingly, *Picalm*, *Vldlr* and *Macf1* amongst others, have been previously identified as alternatively spliced upon *Tardbp* or *Fus* knock-down in the mouse brain<sup>28,29</sup>. In addition, mis-splicing of *Picalm* has been reported in AD patients<sup>30</sup>, mutation-associated alternative splicing of *Dnm1* has been associated with epilepsy<sup>31</sup> and mutations of *Efr3a* have been linked to autism spectrum disorder<sup>32,33</sup>. Taken together, the data indicate that *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN undergo degeneration in a context of global RNA metabolism dysregulation and selective RNA splicing alterations that affect more particularly genes involved in proper neuronal development and function. These altered molecular pathways are reminiscent of other ALS-related genes which directly control RNA metabolism and splicing, *i.e.* *FUS* and *TARDBP* and point to common mechanisms



across causative genes and neuronal subtypes, in, and above ALS context.

## Discussion

In clinics, ALS diagnosis relies on evidences for combined degeneration of CSN and MN. While the origin and propagation of the disease between the two neuronal populations has always been debated<sup>34</sup>, number of studies reported on the somatotopic relationship between cortical and spinal impairments<sup>35-37</sup>, ruling out the possibility that CSN and MN degenerations are independent, and rather supporting a propagation from one neuronal population to the other, whether descendent, from the cerebral cortex to the spinal cord, or ascendant, from the spinal cord to the cerebral cortex (not to be confused with the Wallerian or retrograde degeneration of the MN, from their axonal terminals to their cell bodies). In spite of its classical text book definition, ALS is highly heterogeneous and, amongst other parameters, relative upper (CSN) and lower (MN) motor neuron involvement and site of disease onset greatly vary across ALS patients<sup>38</sup>. Notably, *SOD1* mutant carriers typically present with spinal onset, which for the vast majority of them corresponds to a lower limb onset, and mild upper motor neuron impairment<sup>38,39</sup>. Similarly, mutant *SOD1* mouse models typically present with initial hind limb impairment, and so do the *Sod1*<sup>G86R</sup> mice<sup>18,19</sup>. Here, we took advantage of this well characterized model of the disease to test whether mice could recapitulate the somatotopic relationship between CSN and MN, and contribute to unravel the origin of the degeneration.

Because hyperreflexia and hypertonia that characterize CSN degeneration in Human<sup>5,6</sup> are extremely difficult to assess in rodents, histology has become the standard to evaluate the CSN population in ALS mouse models<sup>12-17</sup>. Here, we chose retrograde labelling approaches to precisely label either the whole CSN population (Fig. 1, 2 and Supplementary Fig. 1), or the lumbar-projecting CSN subpopulation (Fig. 3 and Supplementary Fig. 3), as opposed to IHC, ISH or genetic approaches that allow for labelling of all cortical layer V subcerebral projection neurons amongst which CSN represent only a minority. When combined with

rigorous sampling and counting, retrograde labelling further enabled to test whether sub-populations of CSN, that in rodent are topographically organized along both the medio-lateral and the rostro-caudal axes<sup>21,22</sup>, may be more affected by the disease. We show here that *Sod1*<sup>G86R</sup> mice displayed progressive loss of the whole CSN population (Fig.1 and Supplementary Fig. 2), and that, along the rostro-caudal axis, CSN loss started caudally and progressed rostrally (Fig. 2). Caudally-located CSN mostly project to the lumbar spinal cord and control hind limb movements<sup>21,22</sup>. Quantification of the lumbar-projecting CSN in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice during the course of the disease indicated a significant loss as early as 60 days of age (Fig. 3), 45 days prior to MN cell bodies shrinkage and loss (Fig. 3 and Supplementary Fig. 4), 30 days prior to NMJ denervation, and 15 days prior to onset of weight loss, the first clinical symptom reported in this mouse line<sup>40</sup>. Together, the data indicate that, similarly to what has been reported for ALS patients, CSN and MN degeneration occur in a somatotopic manner in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, with CSN and MN involved in hind limb motor function being affected prior to the other subpopulations. In addition, CSN loss occurs before the first signs of MN degeneration (NMJ denervation), suggesting that, in this model, degeneration likely follows a descending propagation, from the motor cortex to the spinal cord. The data support the corticofugal hypothesis which arose from post-mortem histopathological analyses of brains from ALS brains of patients, and alive DTI studies<sup>8-10</sup>. Interestingly, in spite of the early onset of CSN loss, as many as 66.7% of the whole CSN population and 62.9% of the lumbar-projecting population remain at disease end-stage, indicating the existence of both disease-resistant and disease-vulnerable CSN. In the context of the corticofugal hypothesis, an important question to address in future studies would be to determine which of the loss of the most vulnerable CSN or the maintenance of disease-resistance CSN is the most detrimental to downstream MN, in other words, whether disease propagation from the cerebral cortex to the spinal cord arises from the loss of beneficial input or rather the maintenance of toxic input.



Transcriptomics, amongst other techniques, has largely contributed to our understanding of the molecular pathways leading to MN degeneration<sup>41,42</sup>. Similarly, we reasoned that transcriptomic analysis of CSN purified from adult *Sod1*<sup>G86R</sup> and control mice would unravel the molecular signalling that accompanies CSN degeneration in ALS. To this end, we adapted a method of purification of embryonic and young postnatal cortical neurons<sup>20,25</sup> to adult cortical neurons under both healthy and neurodegenerative conditions, based on FAC Sorting of retrogradely labelled neurons (Fig. 4). We thus purified CSN and CPN from the cerebral cortex of wild type and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice at four disease-relevant adult ages, and conducted RNAseq analysis. To our knowledge, this is the first report on whole projection neuron population purification by FACS from the adult mouse cerebral cortex. In addition, the adapted methodology offers the advantage to utilise the neurons of individual mouse brains as true replicates, instead of pooling the neurons from several brains<sup>20,43</sup>, providing an adapted response to both ethical and statistical requirements. CPN isolated from same mouse brains were chosen as control, for their high similarity with CSN, and their resistance to degeneration (Supplementary Fig. 5) in spite of similar levels of *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene expression (Fig. 5b). Possible future applications of this current method may prove useful to compare gene signatures of affected CSN populations amongst various ALS mouse models, or to highlight the differences between ALS and primary lateral sclerosis (PLS) characterized by CSN degeneration without MN impairment, potentially shedding light on putative propagation mechanisms from CSN to MN in ALS. Beyond this first attempt to unravel CSN alterations in ALS at the level of the population, single cell approaches will be, in the future, instrumental in identifying the mechanisms that discriminate disease-vulnerable from disease-resistant CSN, and contribute to inform the development of therapeutic strategies aimed at maintaining pools of properly functioning CSN<sup>44</sup>.

Analysis of the transcriptomic data first confirmed the selective degeneration of the CSN population and the minor impact of the *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene expression on the CPN population (Fig. 5), in accordance with the histological quantifications (Fig. 1, 3, and Supplementary Fig. 2 and 5). Comprehensive analysis of gene expression data highlights pathways characteristic of ALS<sup>1,2</sup>, such as altered mitochondrial functions, protein folding and catabolism (Fig. 6a). Interestingly, the over-representation of RNA metabolism, including RNA splicing, amongst the most deregulated biological processes, cellular components and molecular functions, further confirmed by high throughput qPCR (Fig. 6) and splicing analysis (Fig. 7) is altogether expected in the context of ALS<sup>1,2</sup>, and novel for a *Sod1*<sup>G86R</sup> mutation. Indeed, altered RNA metabolism is reminiscent of other ALS-related genes which encode RNA binding proteins, such as *TARDBP* and *FUS* and whose knock-downs in the mouse brain are associated with altered RNA splicing<sup>28,29</sup>. Importantly, alternative splicing is also a hallmark of *C9ORF72*-associated mutations and of sporadic ALS<sup>45</sup>, and up-regulation of genes involved in mRNA processing and in RNA metabolic processes were also described in the cerebral cortex of sporadic ALS patients<sup>46</sup>. Gene set enrichment analysis of the statistically significant altered splicing events between WT and *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN unravelled a large representation of genes involved in neuronal development and differentiation, synaptic signalling and neuronal death (Fig. 7b). Again, some of the targeted genes are reminiscent of those affected by *TARDBP* and *FUS* mutations<sup>28,29</sup>, such as the representative *Picalm*, *Vldlr* and *Macf1* (Fig. 7), highlighting altered neuron-specific functions (Supplementary Table 3). The mis-splicing of these transcripts, amongst others, could contribute to altered dendritic shape, synaptic transmission and intrinsic excitability of the CSN/layer V subcerebral projection neurons, which have been reported in various mouse models of the disease<sup>14,16,17,47</sup>, and potentially to overall motor cortex hyperexcitability, an early feature of cortical



impairment in ALS patients<sup>11</sup>. Thus, beyond the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model, the data are relevant to ALS in its broad genetic heterogeneity. This very first molecular temporal sequence of degenerating CSN paves the way to the identification of new therapeutic targets to prevent CSN loss, maintain their proper functioning, and potentially hinder disease spreading to downstream MN.



## Online Methods

### *Animals*

All animal experiments were performed under the supervision of authorized investigators and approved by the local ethical committee of Strasbourg University (CREMEAS, agreements # 00766.01 and 1534-2015082617403748). BAC transgenic male mice with the G86R murine *Sod1* missense mutation<sup>18</sup> were obtained from the animal facility of the Faculty of Medicine, University of Strasbourg. Non-transgenic age-matched male littermates served as controls. Mice received water and regular rodent chow *ad libitum*. *Sod1*<sup>G86R</sup> animals were followed daily, and disease progression was rated according to a clinical scale going from score 4 to 0, as we previously described<sup>19</sup>. End-stage animals were harvested upon reaching score 0, *i.e.* when they were no longer unable to roll over within 10 s after being gently placed on their back<sup>19</sup>.

### *Retrograde labelling of CSN*

Mice were deeply anesthetized with intraperitoneal (i.p.) injection of Ketamine (Imalgène 1000®, Merial; 120 mg/kg body weight) and Xylazine (Rompun 2%®, Bayer; 16 mg/kg body weight) solution and placed on a heating pad. A precise laminectomy was performed in cervical (C3-C4) or lumbar (L1-L2) region of the spinal cord, depending on the experiment, and the animals were positioned below an injector (Nanoject II, Drummond Scientific, PA) mounted on a micromanipulator. Using pulled glass capillaries, the dura was punctured, the capillary lowered to the dorsal funiculus and five pressure microinjections of 23 nl of Fluorogold (Fluorochrome, CO) were performed on each side of the dorsal funiculus. Five days after Fluorogold injection, or upon reaching end stage of the disease, the animals were transcardially perfused with cold 0.01 M PBS, followed by cold 4% PFA in 0.01 M PBS and their brains, spinal cords, tibialis anterior and gastrocnemius muscles were collected.

### *CSN quantification*

Brains from Fluorogold injected animals were cut in 40  $\mu\text{m}$  thick coronal sections on a Leica VT 1000S vibratome (Leica Biosystems) and mounted on slides with DPX mounting solution (SIGMA, 06522-100ML). Sections were imaged under an AxioImager.M2 fluorescence microscope (Zeiss) equipped with a structured illumination system (Apotome, Zeiss) and a highly sensitive black and white camera (Hamamatsu). Images were acquired using the ZEN 2 software (Zeiss). For mice injected in the cervical portion of the spinal cord, all FG-positive neurons present on both hemispheres of 8 equally spaced coronal sections, separated by 480  $\mu\text{m}$  and spanning from 2.10 to -1.70 relative to Bregma, were counted (Supplementary Fig. 1). For mice injected in the lumbar portion of the spinal cord, all FG-positive neurons present on both hemispheres of 3 equally spaced coronal sections, separated by 480  $\mu\text{m}$  and spanning from -0.46 to -1.70 relative to Bregma, were counted (Supplementary Fig. 2). CSN quantification was performed using a macro that we developed on ImageJ (1.48k, NIH) by two experimenters blinded to the age and genotype of the samples. In brief, this macro generates a reversed image and performs a noise reduction with the “Median filter” (radius=2). A Gaussian blur (sigma=25) filtered image is then created and subtracted from the non-blurred image. The result is handled by the “rolling ball radius Subtract Background” algorithm (rolling=18). The edges of the cells are sharpened and enhanced by the “Unsharp Mask filter” (radius=50 mask=0.6). The user then can adjust the automatically set threshold that will be used for the determination of black and white pixels of the binarized image version. The image is then binarized with the “Make Binary” function and subjected to several morphological operations to close (“Close-”) and fill holes (“Fill Holes”) in cells and eliminate small objects (“Erode” and “Dilate”) and separate touching cells by “Watershed” segmentation. If needed, the user can further separate touching cells



(white line drawing between cells), complete the filling of the holes (black brush drawing) and define a ROI around the whole cell population to avoid image border artefacts to be counted. Cells are then counted with the “Analyse particles” function. The macro automatically exports the results as a spreadsheet file and an image file.

The cDNA clone for *Crystallin-mu* (*Crym*) is a kind gift from the Arlotta lab. Riboprobes were generated as previously described<sup>20</sup>. Nonradioactive *in situ* hybridization was performed on 40  $\mu\text{m}$  vibratome coronal brain sections 0.14 mm anterior to Bregma. Selected sections were mounted on superfrost slides and processed using reported methods<sup>48</sup>. Bright field 10X tiles images were acquired with a Nikon microscope equipped with a Nikon Digital Sight DS-U3 camera and run by the Nis Elements 4.0 software. *Crym*-positive neurons were manually counted, on both hemispheres, within layer V, from M2 medially to S1 laterally by two experimenters blinded to the age and genotype of the samples.

### ***Spinal motor neurons quantification***

The L1-L4 lumbar level of the spinal cords were cut on a vibratome into coronal sections of 40  $\mu\text{m}$ . 4 nonadjacent sections spaced by 320  $\mu\text{m}$  were labelled by immunohistochemistry as previously described<sup>49</sup>, using a goat anti-choline acetyltransferase (ChAT) antibody (Millipore) and a biotinylated donkey anti-goat IgG (Jackson). Two images per section (one per ventral horn) were captured using an AxioImager.M2 microscope (Zeiss) equipped with a high-resolution B/W camera (Hamamatsu) and run by the ZEN 2 software (Zeiss). Cells bodies sizes were measured using ImageJ (NIH).

### ***Electromyography***

Mice were anesthetized with a solution of Ketamine/Xylazine (100 mg/kg; 5 mg/kg) and kept under a heating mat to maintain a physiological muscle temperature ( $\pm 31^\circ\text{C}$ ).

Electrical activity was monitored on the muscles of both limbs for at least 2 min as previously described<sup>19</sup>.

### ***Neuromuscular junctions staining and morphological analysis***

Tibialis anterior muscles were dissected into bundles and processed for immunofluorescence with a rabbit anti-synaptophysin antibody, a rabbit anti-neurofilament antibody (Eurogentec) followed by Alexa-conjugated donkey anti-rabbit 488 (Jackson) and rhodamine-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (Sigma-Aldrich), as previously described<sup>49</sup>.

Neuromuscular junctions (NMJs) analysis was performed by an independent age and genotype-blinded observer, directly under and AxioImager.M2 microscope (Zeiss) equipped with a high-resolution B/W camera (Hamamatsu) and run by the ZEN 2 software (Zeiss). On average 500 NMJs per animals were examined. NMJs were considered partially denervated when the presynaptic nerve terminal labelled with synaptophysin was partially observed from the postsynaptic region labelled with  $\alpha$ -bungarotoxin, and denervated when the presynaptic nerve terminal was totally absent. Representative NMJs were imaged using the same microscope setting.

### ***Statistical analyses***

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

### ***CSN and CPN purification***

For FACS experiments, CSN from *Sod1*<sup>G86R</sup> mice and their wild-type littermates were



retrogradely labelled using Green IX Retrobeads (Lumafuor) injected at 25 days of age with the same protocol as for Fluorogold injection. Purification of CSN and CPN were performed in parallel from same WT or *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 30, 60, 90 and 105 days of age. Mice were deeply anesthetized with by an i.p. injection of Ketamine/Xylazine (100 mg/kg; 5 mg/kg) before decapitation. The brains were sectioned in a stainless steel coronal brain matrix (Harvard Apparatus, MA), and 1 mm-thick sections were transferred under a fluorescence SMZ18 microscope (Nikon). The layer V containing labelled CSN and the upper layer II/III above were microdissected from 4 coronal sections and collected in separate tubes filled with iced HABG (Hibernat A (BrainBits UK), B27, Glutamax (Gibco) and 0.1N NaOH ). The microdissected tissues were enzymatically digested with 34 U/ml papain at 37°C for 30 min. Cells were mechanically dissociated by gentle trituration in iced HABG, filtered through 70 µm cell strainer (BD Falcon) and subjected to density centrifugation through a three-density step gradient of Percoll (Sigma, MO) as previously described<sup>50</sup>. Upon centrifugation, the cell pellets were resuspended in cold 0.01 PBS and fixed with 70% EtOH for 30 min at 4°C. Fixed cells were centrifugated to eliminate EtOH and resuspended in 0.01 M PBS complemented with RNase inhibitors (Promega). Microsphere-labelled CSN were purified using the FACS AriaII (BD Biosciences), based on their fluorescence, size and granularity. Unlabelled CPN were purified by FACS, based on their size and granularity. Approximately 2 000 CSN and exactly 2 000 CPN were be obtained from each adult mouse brain and were used as individual biological replicates for RNA sequencing. Upon purification, neurons were centrifugated and frozen as cell pellets.

### ***RNA sequencing***

Full length cDNA were generated from frozen cell pellets using the SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit for Sequencing (Clontech, CA) according to the manufacturer's

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

### ***Data repository***

RNAseq data have been deposited in the ArrayExpress database at EMBL-EBI under accession number E-MTAB-7876 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-7876/>).

### ***RNA sequencing, gene set enrichment, gene network and differential alternative splicing analyses***

Reads were mapped onto the mm10 assembly of mouse genome using Tophat v2.0.14<sup>51</sup> and bowtie v2.1.0 aligner. Gene expression was quantified using HTSeq v0.6.1<sup>52</sup> and gene annotations from Ensembl release 84. Hierarchical clustering of samples was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient as the distance measure<sup>53</sup>. Comparisons between the *Sod1*<sup>G86R</sup> and WT CSN, and between *Sod1*<sup>G86R</sup> and WT CPN samples across ages, and between *Sod1*<sup>G86R</sup> and WT CSN at each age were performed using the method proposed by Love et al.<sup>54</sup> implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.6.3). Thresholds of  $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$  and adjusted p value  $< 0.05$  were chosen to identify significantly



differentially expressed genes. GSEA<sup>26</sup> was performed on a pre-ranked list of 29,017 genes significantly dysregulated in CSN and not CPN, and with an FPKM >14 in more than 90% of samples, using  $-\log_{10}$  of the pvalue x sign of the  $\log_2$ Fold-Change as ranking metric, and the gene set database of Biological Process Ontology (version 2.5) from the MSigDB collections. Enrichment Maps were generated with Cytoscape<sup>55</sup>. Differential alternative splicing analysis was performed using rMATS version 3.2.5<sup>27</sup> on alignments performed with STAR 2.5.3a<sup>56</sup>, and splicing with reads that span splicing junctions were considered for further analysis, using the threshold of FDR < 0.05. GSEA analysis was performed on a list of 1,163 mis-spliced genes, using  $-\log_{10}$  of the FDR as ranking metric. Sashimi plots were generated with *rmats2sashimiplot*<sup>27</sup>.

### ***Fluidigm Validation***

High-throughput qPCR validation was carried out on the Fluidigm's Biomark HD system, according to the manufacturer's protocol. Specifically, 100 ng of RNA were reverse-transcribed using the Reverse Transcription Master Mix Kit (Fluidigm). cDNA was then pre-amplified using 50 nM pooled primer mixture and the PreAmp Master Mix Kit (Fluidigm) for 14 cycles. Unincorporated primers were removed with 8U of Exonuclease I (NEB) and the reaction products were diluted 5-fold in TE Buffer. The treated cDNA's were combined with SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX (Bio-Rad) and loaded onto a 96.96 Dynamic Array integrated fluidic circuit (Fluidigm). Primers used were:

*Aars*, F: TGGTTTCTGGTGGACTTGCAG - R: AAGTCTCCTCGGGAACCTTAGC

*Dars*, F: TCGAGTTAAGGACCTGACAGT - R: CACTGCTTCCCTTTTGCTCT

*Ddx20*, F: TGCACAGCAGAGCTCAACAT - R: GCATCAAGGCGCTGATTCTG

*Eif2b5*, F: GCCACCAACAGGGTTCTTCA - R: CCTGGAACAGGCTCAATGGAA

*Eif3h*, F: AGATCGACGGCCTGGTAGTAT - R: CCTGAACAACCTCAGTGCCT

*Eif4a2*, F: TAGTATTGGCCCCCACCAGA - R: AGCATGACAAGTTGCTCCCA

*Eif4g2*, F: TTATGAAAAGCCAGGGGCTAAG - R: CCGAGGTGGCATATCCTTCG

*Gemin8*, F: CAACTGGAGGGCTAGTGCAT - R: GCATCCAAAGCATTGCGTGAT

*Kars*, F: AGCAAGAAGTGGTGGTAATCAGT - R: CCCTAACAAGCCTGACAGCA

*Nsun2*, F: GAGCGATGCCTTCGAATCCT - R: GACGTTTGTTCACGGCATT

*Ppprf31*, F: CAGCTCGTGTGGACAGCTT - R: GCTCAATCTCATCCTTTAGTTCGT

*Sars*, F: CGTTTCTCTACACAGAACAAGTTGA - R: GGACAAACTCCACCTTCTTGG

*Sf3bp4*, F: GGTGCTGCTGCTTAGAGACG - R: TACACCGTGGCATCCTGATT

*Slbp*, F: CCTGAAAGCTTTACAACCTCCTGA - R: ATCTTCTTCAACTGCACTGGC

*Snrpb*, F: CCCACCTCCAGGCATTATGG - R: TGCCTATAGGTGTCCCACGA

*Trnt1*, F: GTAAGCGGGTCTTCGGAGTA - R: CGCCAATCACACATGCTGC



## References

1. Brown, R. H. & Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **377**, 162–172 (2017).
2. van Es, M. A. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* **390**, 2084–2098 (2017).
3. Taylor, J. P., Brown, R. H. & Cleveland, D. W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* **539**, 197–206 (2016).
4. Weishaupt, J. H., Hyman, T. & Dikic, I. Common Molecular Pathways in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Trends Mol. Med.* **22**, 769–783 (2016).
5. Eisen, A. *et al.* Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **88**, jnnp-2017-315573 (2017).
6. Geevasinga, N., Menon, P., Özdinler, P. H., Kiernan, M. C. & Vucic, S. Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat. Rev. Neurol.* 1–11 (2016).
7. Ling, S.-C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* **79**, 416–438 (2013).
8. Braak, H. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis—a model of corticofugal axonal spread. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 708–714 (2013).
9. Brettschneider, J. *et al.* Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* **74**, 20–38 (2013).
10. Kassubek, J. *et al.* Diffusion tensor imaging analysis of sequential spreading of disease in amyotrophic lateral sclerosis confirms patterns of TDP-43 pathology. *Brain* **137**, 1733–1740 (2014).
11. Vucic, S. & Kiernan, M. C. Transcranial Magnetic Stimulation for the Assessment of

- Neurodegenerative Disease. *Neurotherapeutics* 1–16 (2017).
12. Zang, D. W. & Cheema, S. S. Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1. *Neurosci. Lett.* **332**, 99–102 (2002).
  13. Ozdinler, P. H. *et al.* Corticospinal Motor Neurons and Related Subcerebral Projection Neurons Undergo Early and Specific Neurodegeneration in hSOD1G93A Transgenic ALS Mice. *J. Neurosci.* **31**, 4166–4177 (2011).
  14. Yasvoina, M. V. *et al.* eGFP Expression under UCHL1 Promoter Genetically Labels Corticospinal Motor Neurons and a Subpopulation of Degeneration-Resistant Spinal Motor Neurons in an ALS Mouse Model. *J. Neurosci.* **33**, 7890–7904 (2013).
  15. Handley, E. E. *et al.* Synapse Dysfunction of Layer V Pyramidal Neurons Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model of TDP-43 Proteinopathies. *Cerebral Cortex* **27**, 3630–3647 (2017).
  16. Fil, D. *et al.* Mutant Profilin1 transgenic mice recapitulate cardinal features of motor neuron disease. *Hum. Molecul. Genet.* **364**, ddw429 (2016).
  17. Liu, Y. *et al.* C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron* **90**, 521–534 (2016).
  18. Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H. & Gordon, J. W. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *PNAS* **92**, 689–693 (1995).
  19. Rouaux, C. *et al.* Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J. Neurosci.* **27**, 5535–5545 (2007).
  20. Arlotta, P. *et al.* Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor



- neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207–221 (2005).
21. Ayling, O. G. S., Harrison, T. C., Boyd, J. D., Goroshkov, A. & Murphy, T. H. Automated light-based mapping of motor cortex by photoactivation of channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Nat. Methods* **6**, 219–224 (2009).
  22. Kamiyama, T. *et al.* Corticospinal Tract Development and Spinal Cord Innervation Differ between Cervical and Lumbar Targets. *J. Neurosci.* **35**, 1181–1191 (2015).
  23. Fischer, L. R. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* **185**, 232–240 (2004).
  24. Molyneaux, B. J. *et al.* Novel subtype-specific genes identify distinct subpopulations of callosal projection neurons. *J. Neurosci.* **29**, 12343–12354 (2009).
  25. Ye, Z. *et al.* Instructing Perisomatic Inhibition by Direct Lineage Reprogramming of Neocortical Projection Neurons. *Neuron* **88**, 475–483 (2015).
  26. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS* **102**, 15545–15550 (2005).
  27. Shen, S. *et al.* rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *PNAS* **111**, E5593–E5601 (2014).
  28. Lagier-Tourenne, C. *et al.* Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat. Neuro.* **15**, 1488–1497 (2012).
  29. Polymenidou, M. *et al.* Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat. Neuro.* **14**, 459–468 (2011).
  30. Raj, T. *et al.* Integrative transcriptome analyses of the aging brain implicate altered splicing in Alzheimer’s disease susceptibility. *Nat. Genet.* **50**, 1584–1592 (2018).
  31. Boumil, R. M. *et al.* A Missense Mutation in a Highly Conserved Alternate Exon of

- Dynamin-1 Causes Epilepsy in Fitful Mice. *PLoS Genet.* **6**, e1001046 (2010).
32. Gupta, A. R. *et al.* Rare deleterious mutations of the gene EFR3A in autism spectrum disorders. **5**, 1–14 (2014).
  33. Marui, T. *et al.* Association of the neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) gene variants with autism. *Int. J. Neuropsychopharm.* **12**, 1 (2008).
  34. Ravits, J. M. & La Spada, A. R. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread. *Neurology* **73**, 805–811 (2009).
  35. Mochizuki, Y., Mizutani, T., Shimizu, T. & Kawata, A. Neuroscience Letters. *Neurosci. Lett.* **503**, 73–75 (2011).
  36. Ravits, J., Paul, P. & Jorg, C. Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology* **68**, 1571–1575 (2007).
  37. Zhang, Q. *et al.* Side of Limb-Onset Predicts Laterality of Gray Matter Loss in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–11 (2014).
  38. Swinnen, B. & Robberecht, W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 661–670 (2014).
  39. Millicamps, S. *et al.* SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J. Med. Genet.* **47**, 554–560 (2010).
  40. Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.-L. & Loeffler, J.-P. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *PNAS* 1–6 (2004).
  41. Caballero-Hernandez, D. *et al.* The ‘Omics’ of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Trends Mol. Med.* 1–15 (2015).



42. Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M. & Shaw, P. J. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 616–630 (2011).
43. Molyneaux, B. J. *et al.* DeCoN: Genome-wide Analysis of In Vivo Transcriptional Dynamics during Pyramidal Neuron Fate Selection in Neocortex. *Neuron* **85**, 275–288 (2014).
44. Kulkarni, A., Anderson, A. G., Merullo, D. P. & Konopka, G. ScienceDirectBeyond bulk: a review of single cell transcriptomics methodologies and applications. *Cur. Opin. Biotechnol.* **58**, 129–136 (2019).
45. Prudencio, M. *et al.* Distinct brain transcriptome profiles in C9orf72-associated and sporadic ALS. *Nat. Neurosci.* **18**, 1175–1182 (2015).
46. Andrés-Benito, P., Moreno, J., Aso, E., Povedano, M. & Ferrer, I. Amyotrophic lateral sclerosis, gene deregulation in the anterior horn of the spinal cord and frontal cortex area 8: implications in frontotemporal lobar degeneration. *Aging* **9**, 823–851 (2017).
47. Kim, J. *et al.* Changes in the Excitability of Neocortical Neurons in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis Are Not Specific to Corticospinal Neurons and Are Modulated by Advancing Disease. *J. Neurosci.* **37**, 9037–9053 (2017).
48. Lodato, S. *et al.* Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* **69**, 763–779 (2011).
49. Scekic-Zahirovic, J. *et al.* Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J.* **35**, 1077–1097 (2016).
50. Guez-Barber, D. *et al.* Journal of Neuroscience Methods. *J. Neurosci. Methods* **203**, 10–18 (2012).

51. Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* **14**, R36 (2013).
52. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq — A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
53. Schulze, S. K., Kanwar, R., Izenleuchter, M. G., Therneau, T. M. & Beutler, A. S. SERE: Single-parameter quality control and sample comparison for RNA-Seq. *BMC Genomics* **13**, 1–1 (2012).
54. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 31 (2014).
55. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome e Reserach* **13**, 2498–2504 (2003).
56. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2012).

## **Acknowledgements**

The work has been supported by an ERC starting grant #639737, a Marie Curie career integration grant #618764, an AFM-Telethon trampoline grant #16923 and a Neurex grant to CR, as well as an Inserm/Région Alsace PhD fellowship to CM. Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the “France Génomique” consortium (ANR-10-INBS-0009). The authors are thankful to Drs Luc Dupuis, Jose-Luis Gonzalez de Aguilar, Simona Lodato and Guillaume Tena for critical reading of the manuscript and insightful comments.



## Figure Legends

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

**a.** Schematic of the experimental design: CSN were retrogradely labelled upon Fluorogold (FG) injection into the cervical portion of the spinal cord. Ages of injection and harvesting are indicated. **b.** Representative negatives of fluorescence images of brain coronal sections (Bregma 0.74 mm) showing Fluorogold-labelled CSN in the cerebral cortex of wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mice of 60, 75, 90 and 105 days of age (d) or end stage (ES). Red shapes indicate the positions where close-ups were acquired. **c.** Close-ups showing the progressive loss of labelled CSN over time in the cerebral cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (lower panels) compared to their wild-type littermates (upper panels). **d.** Bar graph representing the average number of CSN present on 8 equally spaced coronal sections along the rostro-caudal axis, matched between *Sod1<sup>G86R</sup>* (orange) and wild-type mice (grey). Note the progressive loss of labelled CSN in the brain of *Sod1<sup>G86R</sup>* animals. \*\*\*  $p < 0.001$  in multiple t tests. Scale bars: 200  $\mu\text{m}$  in **b.** and 50  $\mu\text{m}$  in **c.**

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

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

### Figure 3: Lumbar-projecting CSN degenerate before lumbar MN

**a.** Schematic of the experimental design: CSN were retrogradely labelled upon Fluorogold (FG) injection into the lumbar portion of the spinal cord. Ages of injection and harvesting are indicated. **b.** Bars graph representing the average number of CSN present on 3 equally spaced



caudal coronal sections matched between *Sod1*<sup>G86R</sup> (orange) and wild-type mice (grey), at 60, 75, 90 and 105 days of age (d) or at end stage (ES). Note the early and progressive loss of labelled CSN in the brain of *Sod1*<sup>G86R</sup> animals. **c.** Representative negatives of fluorescence images of brain coronal sections (Bregma -1.06 mm) showing the decreased number of Fluorogold-labelled CSN in the cerebral cortex of *Sod1*<sup>G86R</sup> mice at 60 days of age and at end stage (ES) compared to their wild-type littermates. **d.** Representative images of coronal sections of the spinal cord of wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice at 60 and 105 days (d) or end stage (ES), showing Choline Acetyltransferase-positive neurons (ChAT) present in the ventral horn of the spinal cord. Arrows indicate large ChAT-positive neurons, arrowheads indicate smaller or shrunk ChAT-positive neurons. **e.** Bar graph representing the average number of ChAT-positive neurons counted in the ventral horn of lumbar spinal cord sections of wild-type (grey) and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice (orange) at 60, 75, 90 and 105 days of age end stage (ES). **f.** Bar graph representing the average number of large ChAT-positive neurons, with an area  $\geq 400 \mu\text{m}^2$ , counted in the ventral horn of lumbar spinal cord sections from wild-type (grey) and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice (orange) at 60, 75, 90 and 105 days of age or end stage (ES). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  in multiple t-tests. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  in c. and 50  $\mu\text{m}$  in d.

**Figure 4: Isolation of CSN and CPN from individual adult wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse brains for RNAseq time course analysis**

**a.** Schematic representation of the experimental design: CSN were retrogradely labelled upon green fluorescent microbeads injection into the cervical portion of the spinal cord. The brains were then sectioned coronally to allow the microdissection of the layers II/III and V separately, followed by dissociation of the tissues and FACS purification of the CSN and CPN populations. **b.** Schematic representation of the ages of CSN labellings, and CSN and CPN harvestings. **c.** Representative fluorescence image of a brain coronal section upon CSN

retrograde labelling, showing green fluorescent microbeads-labelled CSN within the layer V of the motor and somatosensory areas, and indicating the two microdissected areas (left, green and grey boxes; scale bar: 200  $\mu$ m), along with representative FACS plots (right) of CPN (top) and CSN (bottom) purifications. RFP: Red Fluorescent protein; GFP: Green Fluorescent Protein; SSC: Side scatter; FSC: Forward scatter. **d.** Heatmap with unsupervised clustering of 45,337 mRNA transcripts in 57 samples calculated on the SERE coefficient that quantifies global RNA-seq sample differences. Shades of green or red identify wild-type versus *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN samples respectively across ages. Shades of blue or pink to identify wild-type versus *Sod1*<sup>G86R</sup> CPN samples respectively across ages. **e.** Heatmap of gene expression patterns for known subtype-specific genes confirms the identities of the two isolated neuronal populations, across genotypes and ages.

**Figure 5: Disease progression differentially affects the transcriptomes of CSN and CPN in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice**

**a.** Principal component analyses ran on 45,337 mRNA transcripts in  $n = 29$  CSN (left) and 28 CPN samples (right). Triangles represent CSN, with shades of green or red to identify wild-type versus *Sod1*<sup>G86R</sup> samples respectively. Circles represent CPN with shades of blue or pink to identify wild-type versus *Sod1*<sup>G86R</sup> samples respectively across ages. The dotted line highlights the segregation of *Sod1*<sup>G86R</sup> versus wild-type CSN. **b.** p-values histograms of CSN (green, left) versus CPN samples (grey, right), showing the large proportion of significantly dysregulated genes amongst CSN samples as opposed to CPN samples. Inserts represent the mean expression over replicate samples of *Sod1* mRNA across ages and genotypes for CSN (left) and CPN (right). **c.** Volcano plots of t-statistics, obtained upon exclusion of the overexpressed *Sod1* gene, showing the differential expression of genes between *Sod1*<sup>G86R</sup> and wild-type CSN at 30, 60, 90 and 105 days. For a better visualisation of these plots, *Sod1* and *Gm8566* genes have not been represented. Orange and blue dots respectively correspond to



significantly up- and down-regulated genes. **d.** Venn diagrams showing the relative numbers of significantly dysregulated genes in the two neuronal populations, CSN in green and CPN in grey, at each age analysed. Upper halves of the circles over the orange background correspond to up-regulated genes, lower halves over the blue background to down-regulated ones.

### **Figure 6: Gene Set Enrichment Analysis of diseased CSN reveals altered RNA metabolism**

**a.** Gene set enrichment analysis (GSEA) of 29,017 ranked genes for GO terms of Biological Processes. The 15 most enriched positive (orange) and negative (blue) categories are listed according to their normalized enrichment score (NES) and False Discovery Rate (FDR), and the numbers of corresponding genes (Size) are indicated. Arrows indicate the redundancy and overrepresentation of GO terms related to RNA metabolism. **b.** Enrichment map representing the first sub-network identified with cytoscape. Nodes represent gene sets, and their size is proportional to the number of corresponding genes. Edges represent overlaps between gene sets, and their width is proportional to the number of overlapping genes. Node colour and intensity vary with the corresponding NES: orange for positive and blue for negative NES respectively, the darker the higher. Dotted blue line circles the GO terms linked to RNA metabolism. **c.** Heatmap of expression patterns of genes involved in RNA metabolism and identified by gene set enrichment analysis. Asterisks indicate genes related to motoneuron and/or neurodevelopmental diseases. **d.** Schematic representation of the microdissected layers V from 60 day-old wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* mouse brains (left) and validation of candidate genes by high throughput qPCR (graph bar, right). **d.** Schematic representation of the microdissected cortical plate from E14.5 wild-type and *Sod1<sup>G86R</sup>* embryos (left) and validation

of candidate genes by high throughput qPCR (graph bar, right). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  between wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> samples.

**Figure 7: *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN degeneration is correlated with numerous alternative splicing events that mostly affect neuronal genes.**

**a.** Schematic representation of the different alternative splicing events (left panel) identified between 90 day-old wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> CSN samples, and the corresponding number of events for each type (right bar graph). **b.** Gene set enrichment analysis (GSEA) of 1,163 ranked genes for GO terms of Biological Processes. The 20 most enriched categories are listed according to their normalized enrichment score (NES) and p-value, and the numbers of corresponding genes (Size) are indicated. Arrows indicate the redundancy and overrepresentation of GO terms related to neuronal development and function. **c.** Sashimi plots representing alternative splicing events identified between wild-type (blue) and *Sod1*<sup>G86R</sup> (orange) CSN samples for four selected genes: *Dnml1*, *Picalm*, *Ppp1r9a*, *Efr3a*, *Vldlr* and *Maefl*. Chromosomal positions are indicated below each graph, and relevant exons are represented as black boxes. Arrows indicate significant alternative splicing event.

**Supplementary Figure 1: Retrograde labelling of CSN upon Fluorogold injection in the cervical portion of the spinal cord**

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



**Supplementary Figure 2: The population of *Crym*-positive neurons progressively disappears from the layer V of the motor cortex of *Sod1<sup>G86R</sup>* mice**

**a.** Representative images of *in situ* hybridization on brain coronal sections (Bregma 0.14 mm) of end stage *Sod1<sup>G86R</sup>* and 115 day-old wild-type control mice showing decreased *Crym* expression in the layer V of the cerebral cortex. Dotted red rectangles indicate the areas where *Crym*-positive neurons were counted. **b.** Close-ups of the M1 area. **c.** Bar graph representing the percentage of *Crym*-positive neurons in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice (orange) relative to their wild-type littermates (grey) at 60, 90, 105 and 115 days (d) of age or end stage (ES). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Scale Bar = 200 $\mu$ m in a. and 100 $\mu$ m in b.

**Supplementary Figure 3: Retrograde labelling of CSN upon Fluorogold injection in the lumbar portion of the spinal cord**

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

**Supplementary Figure 4: In *Sod1<sup>G86R</sup>* mice, NMJ denervation starts after 75 days**

**a.** Bar graph representing the proportion of animals with electromyography (EMG) recordings of denervated (orange) or innervated (grey) muscles. **b.** Representative electromyography recordings of innervated (left) and denervated (right) muscles. **c.** Bar graph representing the average proportions of innervated (grey), partly denervated (orange) or fully denervated (red) neuromuscular junctions (NMJ) upon staining and microscopy analysis of one tibialis anterior muscle of wild-type *Sod1<sup>G86R</sup>* mice at 60, 75, 90 and 105 days of age or end stage (ES). **d.**

Representative maximum intensity projection images of z-stacks of typical innervated, partly or fully denervated NMJ from 90 day-old *Sod1*<sup>G86R</sup> and wild-type mice. \* p<0.05; \*\*\* p<0.001 in multiple t-test. Scale Bar = 10 µm.

**Supplementary Figure 5: In *Sod1*<sup>G86R</sup> mice, the number of CUX-2 positive CPN remains stable over time**

**a.** Representative fluorescence images of CUX2 staining on brain coronal sections from 60 day-old wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice. **b.** Representative close-ups of CUX2 staining on brain coronal sections from wild-type and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice of 60, 75, 90 or 105 days (d) of age of end-stage (ES). **c.** Bar graph representing the average number of CUX2-positive nuclei on close-ups of matched brain coronal sections from *Sod1*<sup>G86R</sup> (orange) and wild-type mice (grey). \*\*\* p<0.001 in multiple t-tests. Scale bars: 200 µm in a. and 50 µm in c.

**Supplementary Figure 6: Enrichment map.**

Nodes represent gene sets, and their size is proportional to the number of corresponding genes. Edges represent overlaps between gene sets, and their width is proportional to the number of overlapping genes. Node colour and intensity vary with the corresponding NES: orange for positive and blue for negative NES respectively, the darker the higher. The dotted line circles the GO terms linked to RNA metabolism.

**Supplementary Table 1**

GSEA analysis of transcriptomic data: Gene Ontology (GO) terms for Biological Processes (BP), Cellular Components (CC) and Molecular Functions (MF).

**Supplementary Table 2**

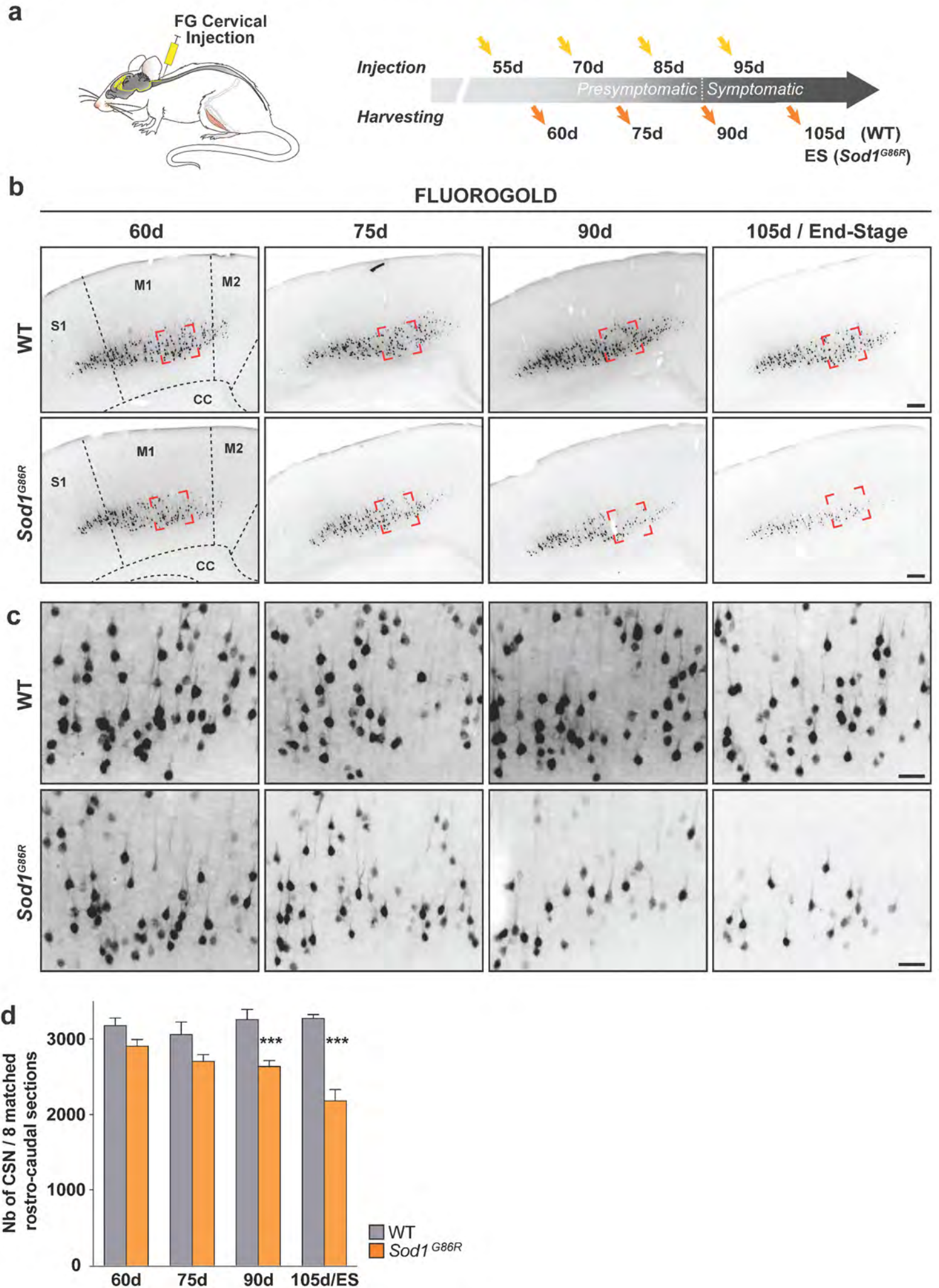
Genes involved in RNA metabolism and already linked to motoneuron and/or neurodevelopmental diseases.

### **Supplementary Table 3**

GSEA analysis of 1,163 ranked mis-spliced genes, for the GO terms Biological Process, Cellular Component and Molecular Function.

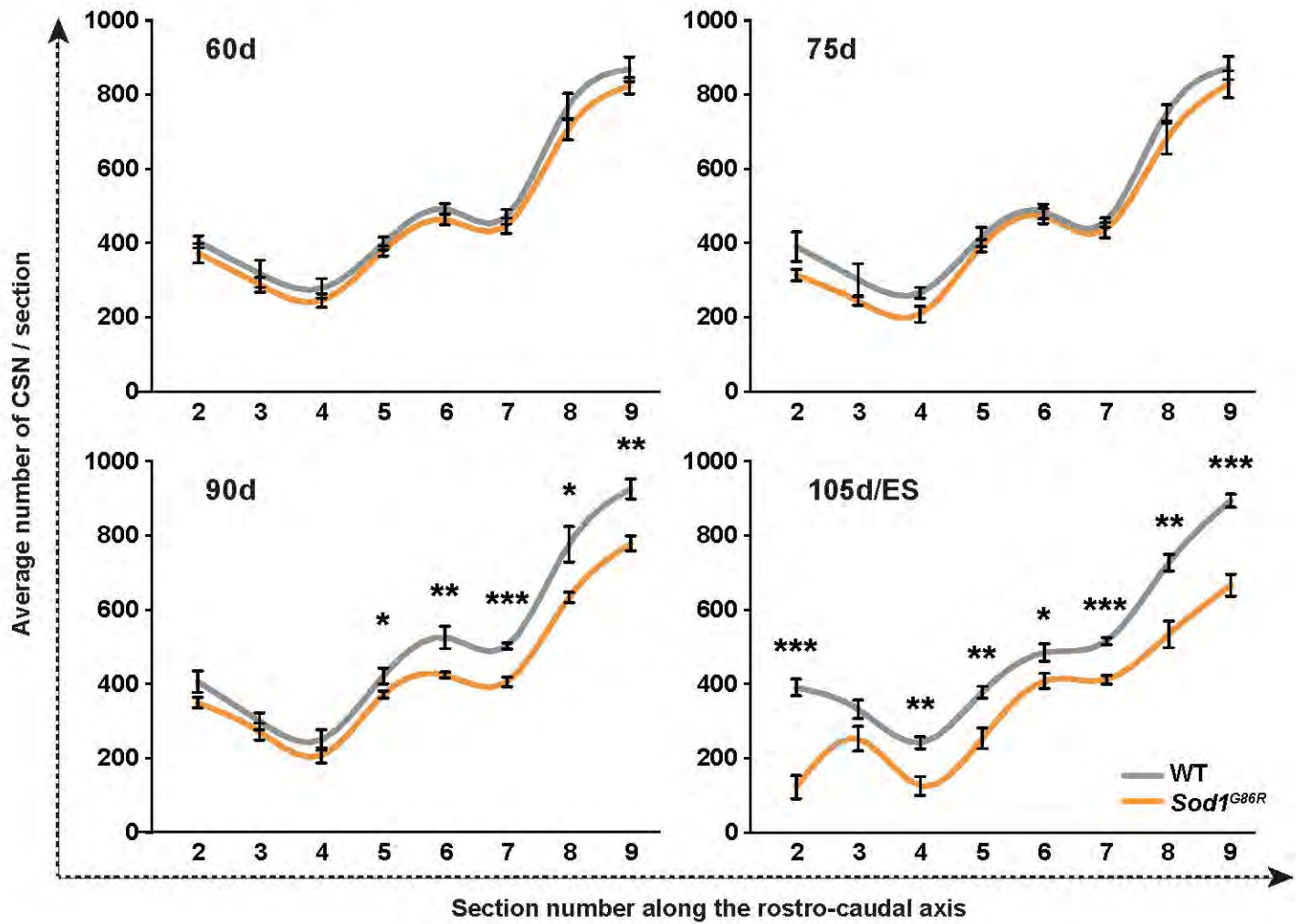


Marques et al., Figure 1

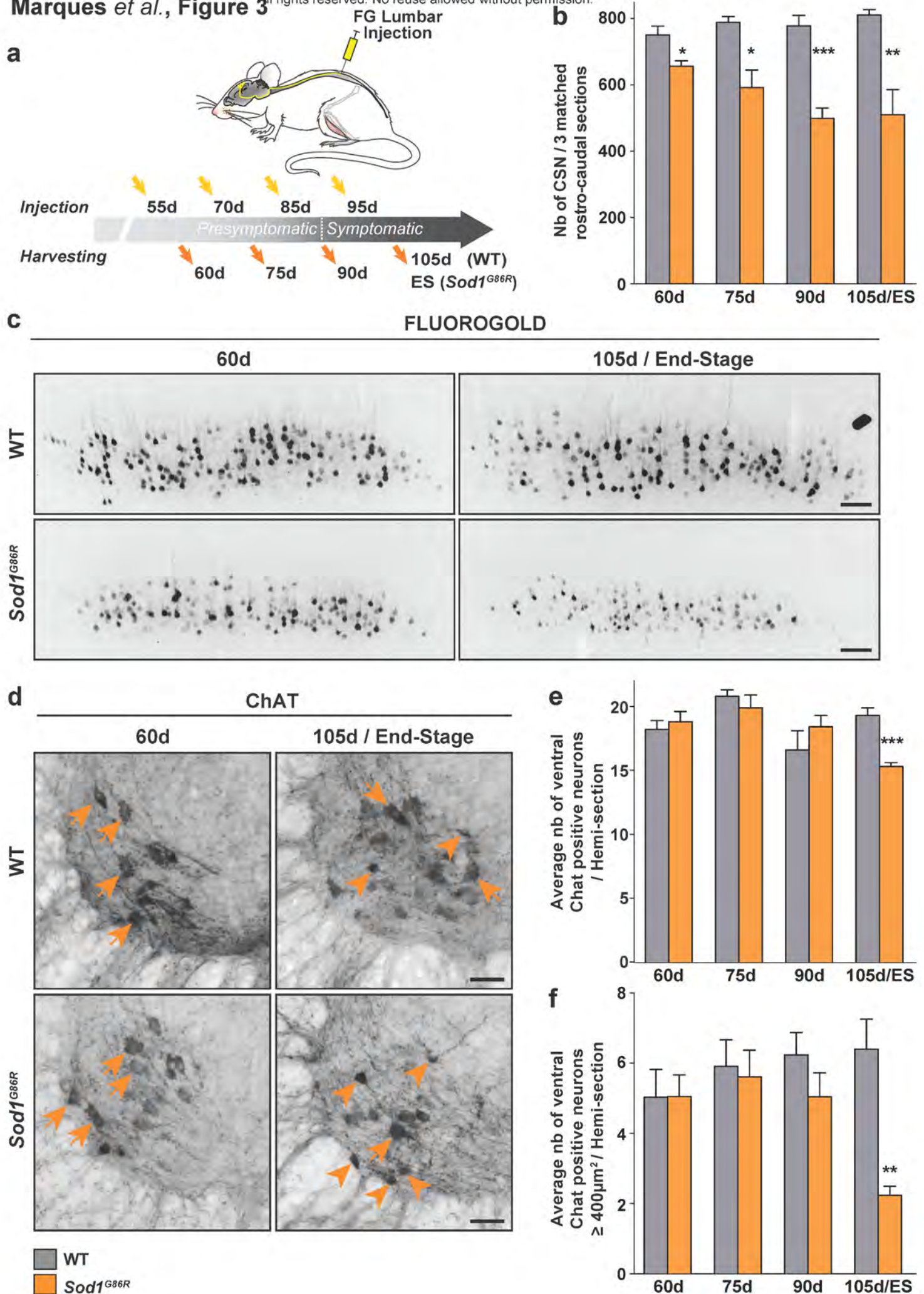




Marques *et al.*, Figure 2

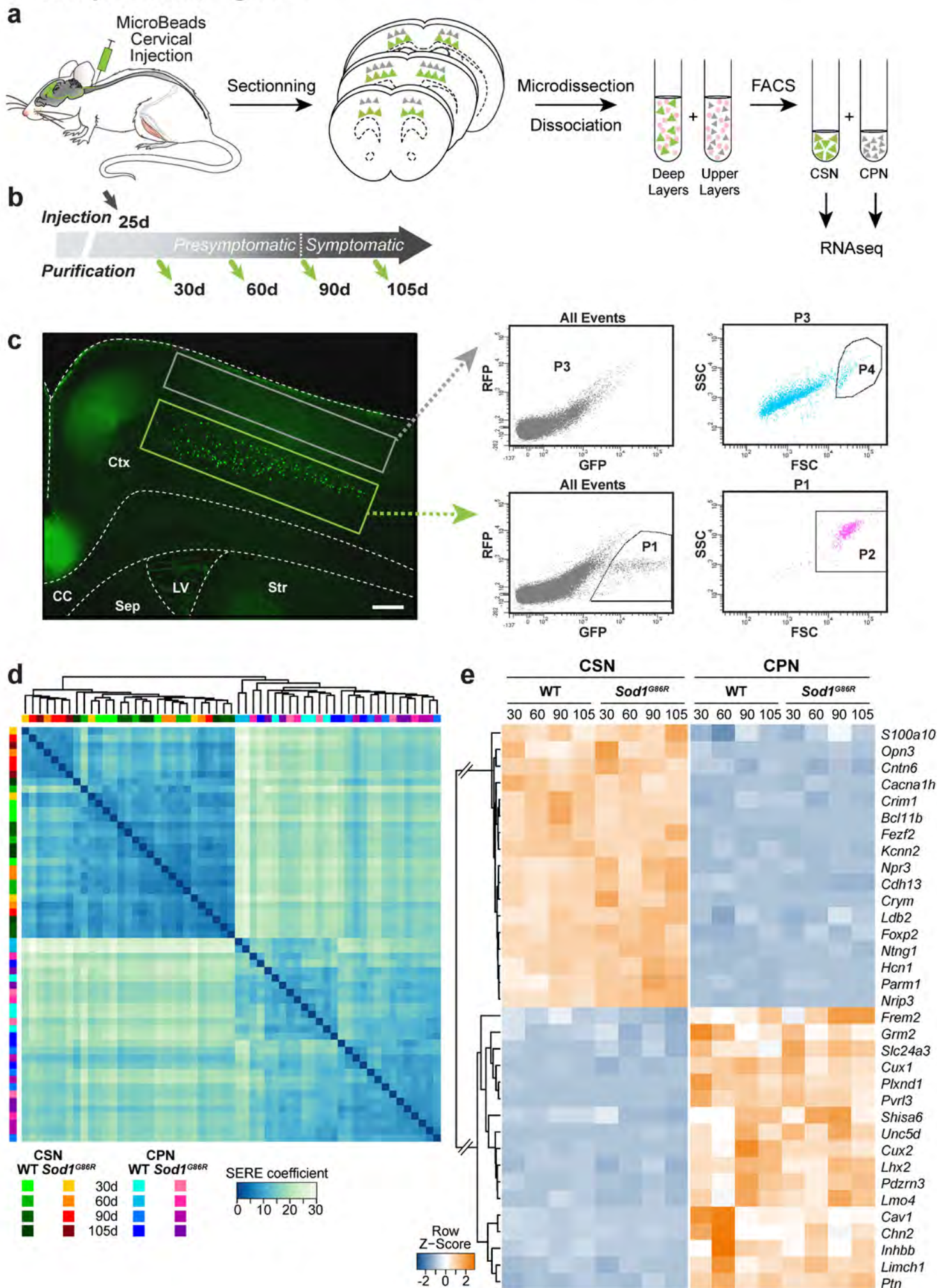


### Marques *et al.*, Figure 3

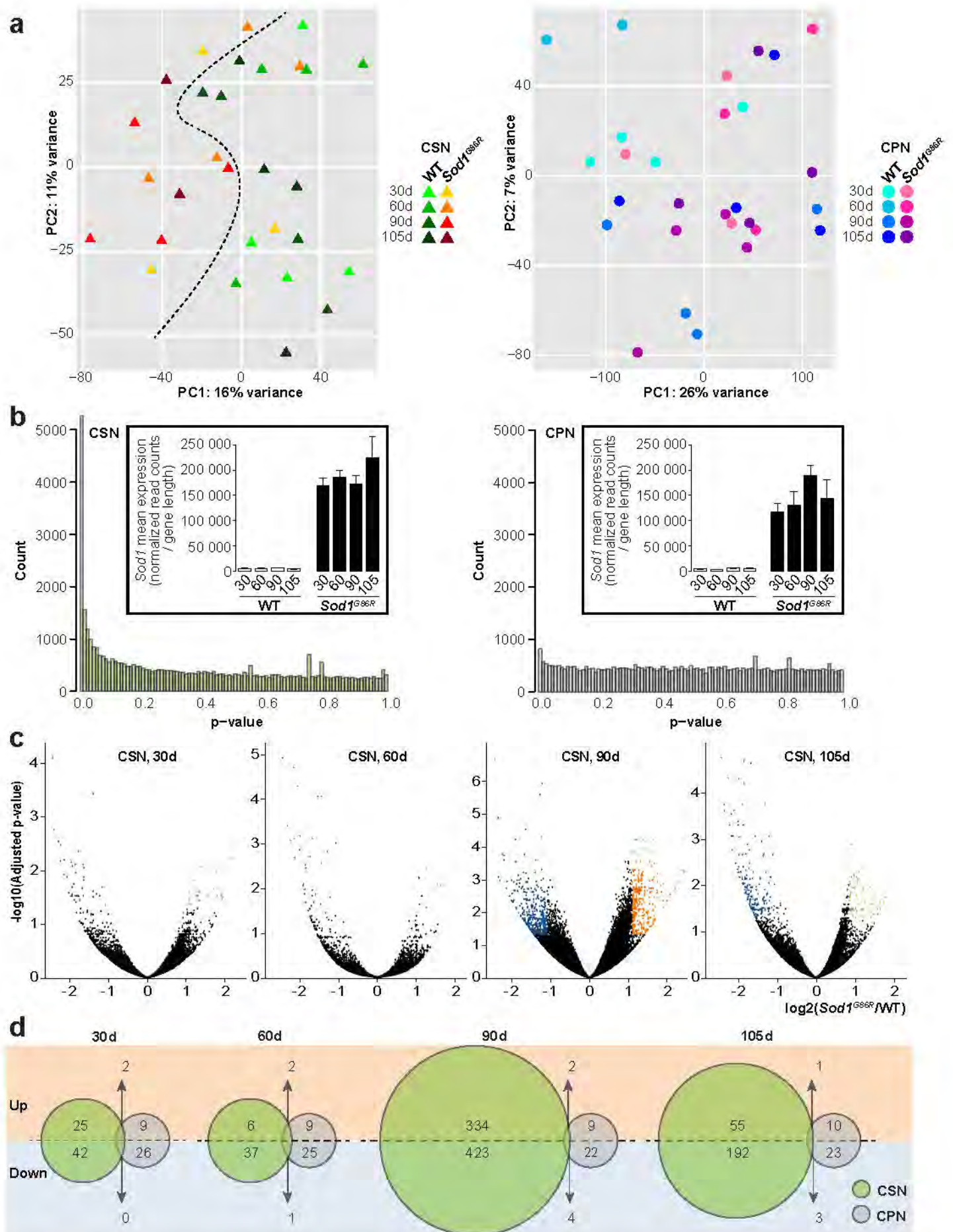




## Marques *et al.*, Figure 4

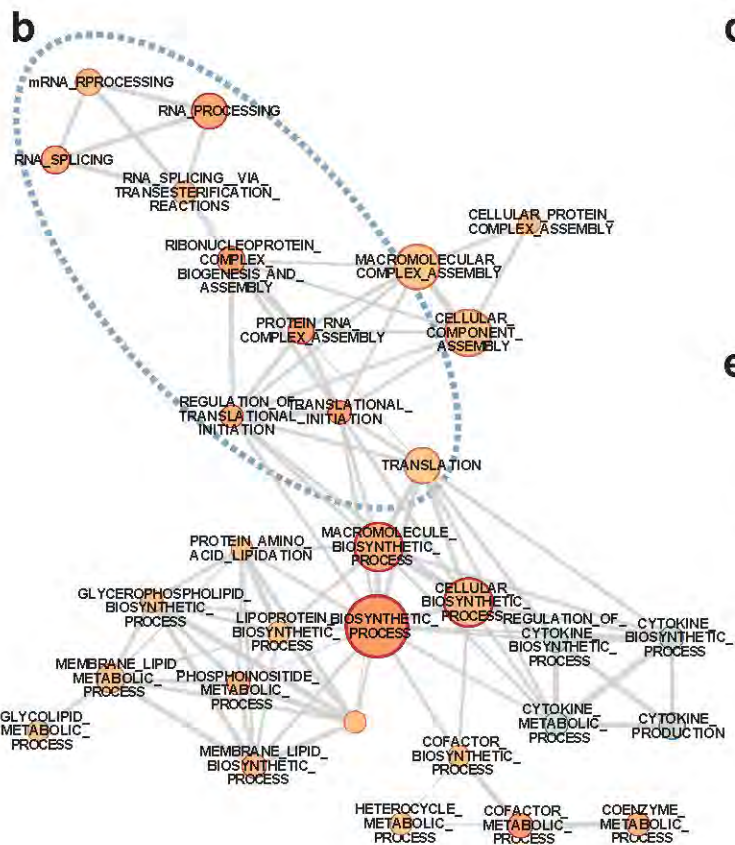
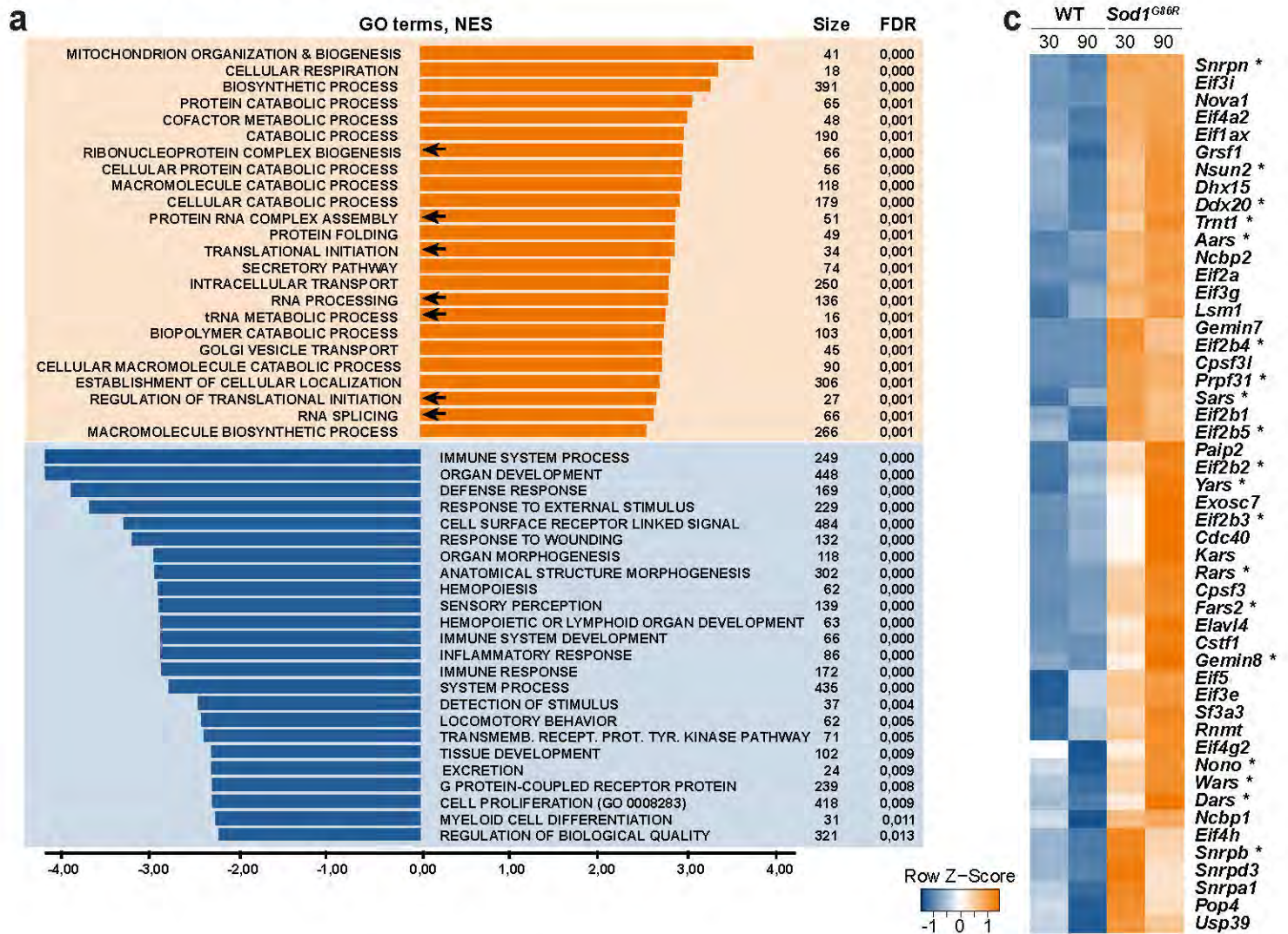


## Marques *et al.*, Figure 5



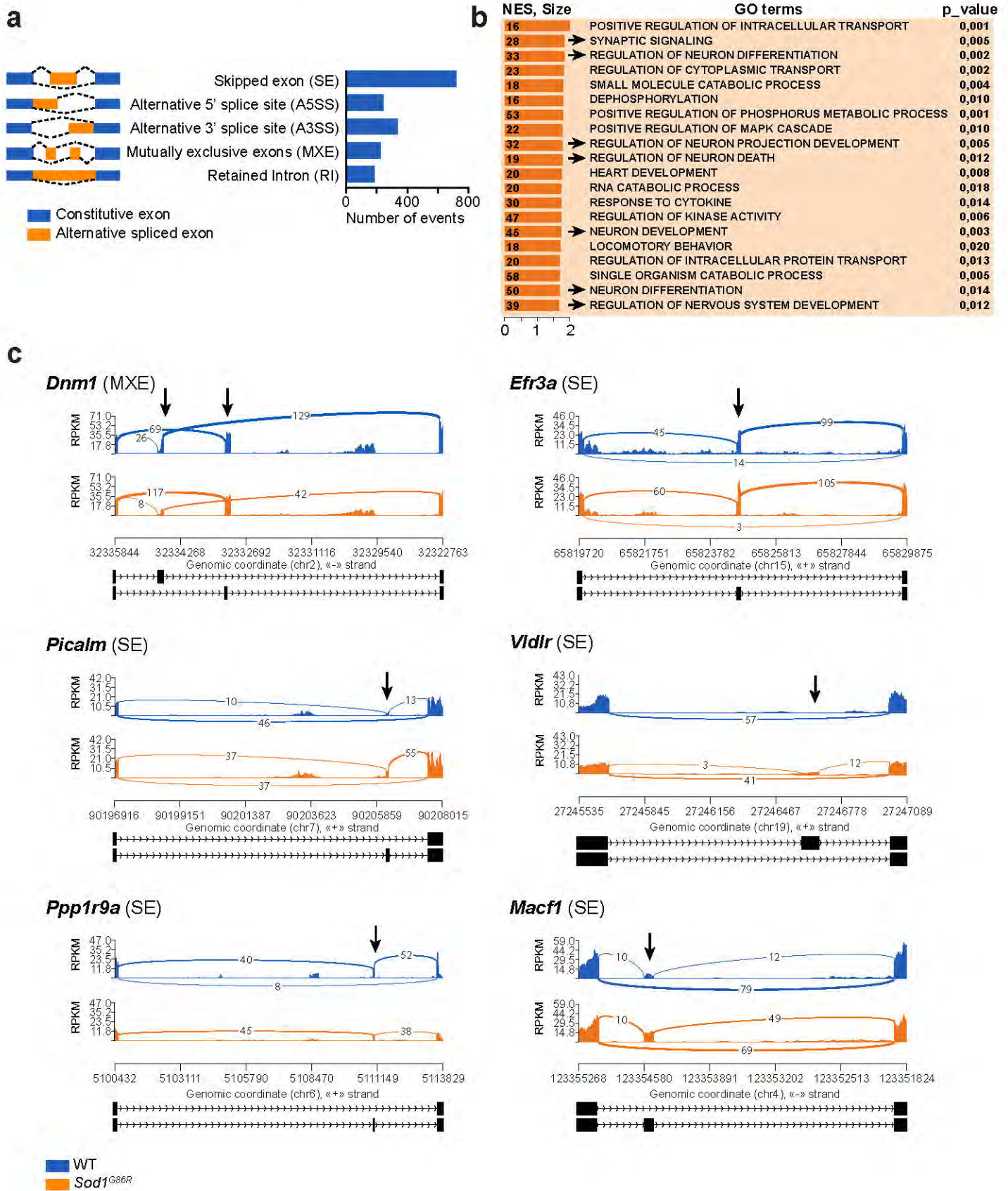


## Marques *et al.*, Figure 6





## Marques *et al.*, Figure 7



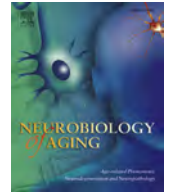
## Annexe 3 : Publication N°2

Cet article traite le vieillissement normal chez la souris âgée *via* des tests comportementaux mnésiques de séparation de pattern, des exercices basés sur la différenciation d'objets similaires ou de localisations différentes. Les résultats montrent une diminution graduelle des performances cognitives au cours de la vie adulte des souris. De manière intéressante, un traitement à la D-Serine, une molécule connue pour être un activateur cognitif, permet de bloquer le déclin cognitif et restaurer des capacités normales dans le test de séparation de pattern chez un sujet âgé. Dans cette étude, j'ai réalisé le développement et la mise au point du protocole de séparation de pattern basé sur la différenciation d'objets similaire. J'ai pu apporter les premiers résultats montrant la baisse des capacités mnésiques chez les sujets âgés.



Contents lists available at ScienceDirect

## Neurobiology of Aging

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neuaging](http://www.elsevier.com/locate/neuaging)

## Age-related vulnerability of pattern separation in C57BL/6J mice

Aurélia Cès<sup>a</sup>, Thibaut Burg<sup>a</sup>, Karine Herbeaux<sup>a</sup>, Céline Héraud<sup>a</sup>, Jean-Bastien Bott<sup>a</sup>, Ayikoe Guy Mensah-Nyagan<sup>b</sup>, Chantal Mathis<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Université de Strasbourg, CNRS UMR 7364, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), 12 Rue Goethe, Strasbourg, France<sup>b</sup> Université de Strasbourg, INSERM U1119, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques, Bâtiment 3 de la Faculté de Médecine, 11 Rue Humann, Strasbourg, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 April 2017

Received in revised form 25 September 2017

Accepted 16 October 2017

Available online 25 October 2017

## Keywords:

Cognitive aging  
Pattern separation  
Object location  
Object feature  
D-serine

## ABSTRACT

Aging is associated with impaired performance in behavioral pattern separation (PS) tasks based on similarities in object features and in object location. These deficits have been attributed to functional alterations in the dentate gyrus (DG)-CA3 region. Animal studies suggested a role of adult-born DG neurons in PS performance. The present study investigated the effect of aging in C57BL/6J mice performing PS tasks based on either object features or object location. At the age of 18 months or more, performance was severely impaired in both tasks. Spatial PS performance declined gradually over adult lifespan from 3 to 21 months. Subchronic treatment with the cognitive enhancer D-serine fully rescued spatial PS performance in 18-month-old mice and induced a modest increase in the number of 4-week-old adult-born cells in the DG. Performance of mice in these PS tasks shows an age dependence, which appears to translate well to that found in humans. This model should help in deciphering physiological changes underlying PS deficits and in identifying future therapeutic targets.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

In everyday life, we often have similar experiences in similar contexts. Thus, the ability to discriminate individual experiences based on specific memories appears particularly useful in daily activities (Conway, 2009). In humans and animals, aging is known to affect performance in tasks evaluating the ability to detect subtle changes in object position or features between successive sample and test sessions (e.g., Reagh et al., 2014; Stark et al., 2010; Toner et al., 2009). These tasks are often called behavioral pattern separation (PS) tasks, in reference to the pattern separation computational model. This model defines a system capable of orthogonalizing overlapping inputs into nonoverlapping outputs, which could potentially resolve interference between similar memories (Marr, 1971; Rolls and Kesner, 2006). Separation-like functional magnetic resonance imaging activity related to PS performance was reported in medial temporal structures, especially within the dentate gyrus (DG)-CA3 region (Bakker et al., 2008; Reagh and Yassa, 2014). Impaired PS performance in the elderly correlated with altered DG-CA3 activation and reduced the integrity of medial temporal lobe connectivity (Lacy et al., 2010; Yassa et al., 2011).

An involvement of the DG-CA3 region in behavioral PS was also repeatedly shown in animal studies using various experimental approaches, from lesions to genetic manipulation (e.g., Deng et al., 2013; Gilbert et al., 2001; Goodrich-Hunsaker et al., 2008; Leutgeb et al., 2007). Manipulation of the level of dentate adult neurogenesis and changes in dentate *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) functionality was shown to affect memory performance in PS tasks based on object features, spatial location or context (e.g., Bolz et al., 2015; Clelland et al., 2009; Creer et al., 2010; Kannangara et al., 2014; McHugh et al., 2007; Sahay et al., 2011; Tronel et al., 2012). However, it must be noted that the role of adult-born DG neurons in a PS-like computation within the DG has often been questioned (Becker, 2016; Deng et al., 2013; Groves et al., 2013). Surprisingly, despite a growing literature investigating the neuronal basis of behavioral PS in adult animals and extensive evidence for its high sensitivity to aging in humans, only a few studies investigated PS in aged animals (e.g., Creer et al., 2010; Gracian et al., 2013; Marrone et al., 2011; Wu et al., 2015). The rare attempts to restore PS performance in aged mice were based on the neurogenesis hypothesis, and resulted in mixed outcomes. Exercise provided only a moderate improvement in PS performance in 22-month-old mice, and their level of DG neurogenesis remained very low, whereas it boosted both performance and neurogenesis in 3-month-old mice (Creer et al., 2010). Wu et al. (2015) reported that exercise completely overcame severe PS deficits in 18-month-old mice performing a

\* Corresponding author at: Université de Strasbourg, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, CNRS-UMR7364, 12 Rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France. Tel.: +33 3 68 85 18 76; fax: +33 3 68 85 19 58.

E-mail address: [chantal.mathis@unistra.fr](mailto:chantal.mathis@unistra.fr) (C. Mathis).



contextual discrimination task, but with only a slight increase in the number of new DG neurons.

The first aim of the present study was to characterize the effect of age on PS performance in C57BL/6J mice. We developed 2 novelty detection tasks based on object features and object location respectively, using a sample trial and a test trial to be as close as possible to the computer-based tasks used in humans (Reagh et al., 2014; Stark et al., 2013). The second aim was to restore spatial PS performance in aged mice by means of D-serine, an endogenous co-agonist of NMDAR known to reverse age-dependent impairment of synaptic plasticity and cognitive performance in rodents and humans (Avellar et al., 2016; Levin et al., 2015; Mothet et al., 2015). Survival of new-born DG cells was subsequently quantified to examine whether D-serine modulates neurogenesis in aged mice (Sultan et al., 2013).

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

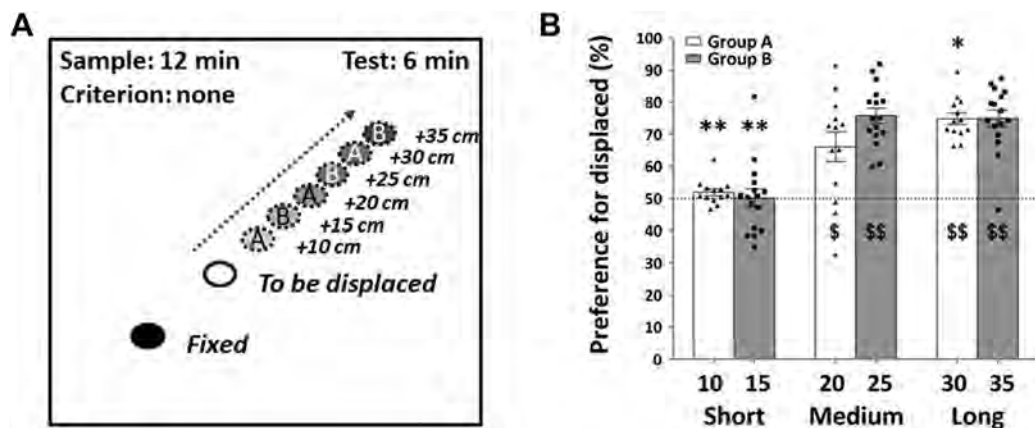
C57BL/6J male mice were obtained from Charles River Laboratories (France). Procedures were in compliance with rules of the European Community Council Directive 2010-63 and French Department of Agriculture Directive 2013-118 and approved by the local review board (CREMEAS: AL/14/21/02/13, AL/11/18/02/13 and APAFIS#2154). Animal facilities were approved for animal experimentation (H 67-482-13). On arrival, mice were group-housed with food and water ad libitum, nesting material, and additional food pellets on bedding to promote natural behavioral patterns. The animal room was under controlled temperature ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) and a 12/12-hour light/dark cycle (lights on at 8.00 AM). Behavioral testing took place during the light phase. Mice were single-housed for 1 week before testing, due to a possible age-dependent confounding factor detected in previous pattern discrimination studies: when unrelated C57BL/6J males were obtained at different ages, as in the present study, a large subset of 5- to 12-month-old mice showed systematic aggressive behavior, especially toward mice returning to the home cage after habituation and discrimination sessions. C57BL/6J male mice fighting in the home cage is well documented and can cause variations in behavior and brain function (e.g., Greenberg et al., 2014). General health status was checked with particular attention to exclude vibrissae alterations (barbering) and eye abnormalities (e.g., cataract or closed eye) liable to bias PS performance.

### 2.2. Spatial pattern separation task

Rodents have a spontaneous tendency to preferentially re-explore an object displaced within a familiar context (Ennaceur et al., 1997). In principle, PS ability should be evaluated with object displacement close to the limits of behavioral detection. The task began with 1 or 2 daily 10-minute habituation sessions in the presence of 2 identical objects, never experienced before, each positioned 30 cm from the walls on the midline of the open field ( $92.5 \times 92.5 \times 35$  cm; Ugo Basile, Italy; 30 lux in the center). On the following day(s), the mice received a daily session consisting of a sample trial (duration specified for each experiment), then 4 minutes in the home cage, and a 6-minute test trial. For each sample-test session, a new pair of identical objects was positioned on the diagonal of the open field (see Fig. 1A). For the sample trial, the fixed object was always 37 cm from the corner, and the second object was 20 cm away from the fixed object. During the test trial, the second object could be moved 10, 15, 20, 25, 30, or 35 cm further along the diagonal. Object exploration was defined as active exploration with the nose pointing toward an object within 2 cm. Sitting on or next to or licking or gnawing the object was not considered as exploration. Equal interest for both objects during sample trials was systematically checked for each group (i.e., absence of location preference). Spatial discrimination performance was evaluated as time spent exploring the displaced object as a percentage of total exploration time for the 2 objects during the first 3 minutes of the test trial. This performance was expected to be higher than the 50% chance level if the mouse detected the object displacement. For the last 3 minutes of the test trial, performance was lower and closer to chance level, suggesting that mice expressed novelty detection behavior mainly during the first 3 minutes. Objects (5–6.5 cm diameter, 4.5–7 cm high) composing each pair were selected so as to induce similar exploration times in preliminary studies: a napkin ring, a candlestick, and an egg-cup, each topped with marbles of different size and color. Habituation objects were less than 10 cm in height and diameter.

### 2.3. Object pattern separation task

Rodents also have a tendency to explore preferentially a new rather than a familiar object in a familiar context (Ennaceur and Delacour, 1988). Object PS ability was evaluated using a new object that was very similar to the familiar one. Two groups of mice (aged 4 and 18 months) were familiarized for 2 days (10 min/d)



**Fig. 1.** Behavioral novelty responses to a wide range of object displacements in 6-month-old C57BL/6J mice. (A) Each group, A and B, was tested on 3 distance categories: short, medium, and long displacement of the object between sample trial and test trial. (B) Test trial performances for each group and for each distance category are shown as mean ( $\pm$  standard error of the mean) percentage time spent exploring the displaced object during the first 3 minutes. NK post hoc test: \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus medium-distance performance within a group. Student  $t$  test:  $^{\$}p < 0.05$  and  $^{\$\$}p < 0.001$  versus 50% chance level.

with the open field (52 × 52 × 40 cm; 40 lux in the center) in presence of 2 objects, renewed each day. The next 2 days, the daily session consisted of a sample trial with a pair of identical objects, followed by 4 minutes in the home cage, and a 10-minute test trial with one of the pair of objects replaced by a new one that was either very similar or not. The 2 objects were always positioned in the same adjacent corners (10 cm from the walls). Absence of side preference was checked for each group during sampling. The position of the new object and its level of similarity were counterbalanced over groups and days. Two sets of objects with different levels of similarity were used, 1 for each test day. Each triplicate of familiar objects was constructed from Lego bricks, with a fixed number of bricks per color. For each set of familiar objects, an identical set of bricks was used to construct 2 novel objects with exactly the same shape as the familiar objects, but 1 with high and the other with low similarity. All objects had an identical gray Lego sheet as a base, which could be secured to the floor with Patafix (UHU). Performance was evaluated as the percentage of total exploration time for the 2 objects spent exploring the new object during the whole test trial. All other procedures were similar to those previously described.

### 2.3.1. Spatial navigation tasks

As aged mice showed profound deficit in the spatial PS task, we checked whether the same mice would also show deficits in other spatial tasks routinely used in our laboratory, such as the Morris water-maze task or the Barnes maze task (Moreau et al., 2008). Two subsets of young and old mice evaluated in the spatial PS task (1 per experiment) were subsequently tested on 1 or other of these tasks (Supplementary Material and Methods).

### 2.4. Drug administration, immunohistochemistry, and image analysis

In the last experiment, all mice received 3 intraperitoneal (IP) injections of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; Sigma-Aldrich; diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.4, 40 °C, 100 mg/kg/injection, 0.1 mL/kg/injection) at 9.00 AM, 11.00 AM, and 2.00 PM in a single day, exactly 28 days before testing spatial PS performance. This 4-week interval was based on studies suggesting a role of 3- to 4-week-old DG neurons in spatial and contextual PS performance (Imielski et al., 2012; Kheirbek et al., 2012; Nakashiba et al., 2012). For D-serine (Sigma-Aldrich; diluted in 0.9% NaCl solution), we selected a subchronic 50 mg/kg IP treatment known to improve both memory performance and survival of new DG neurons in mice (Bado et al., 2011; Filali and Lalonde, 2013; Sultan et al., 2013). Mice were injected with D-serine or vehicle (0.1 mL/kg) once per day (9:00 AM) for 7 consecutive days beginning 18 days after BrdU injection and completed the day before the drug-free test period. This treatment period (days 18–24) corresponded to a critical period of new-born DG neuron maturation and survival (Snyder et al., 2009; Veyrac et al., 2013). Treatment was applied a few days earlier than in the 28-day protocol used by Sultan et al. (2013), as a pilot study showed that repeated injection during the test period had a deleterious effect on PS performance.

One day after testing, mice were deeply anesthetized (120 mg/kg pentobarbital, 10 mL/kg, IP) before intracardiac perfusion with phosphate-buffered saline (PBS, 0.1% heparin), followed by 4% paraformaldehyde solution (Carl Roth GmbH + Co KG, Germany; 0.1-M phosphate buffer, pH 7.4, 4 °C). Brains were postfixed 24 hours in 4% paraformaldehyde (4 °C) and stored in PBS (4 °C). 50- $\mu$ m coronal sections (Leica Biosystems vibratome) were stored free-floating at –20 °C in a cryostorage solution (30% glycerol, 30% ethylene glycol, and 0.026 M phosphate buffer). For immunostaining, sections were PBS-rinsed and incubated 15 minutes in 2N HCl at

37 °C. After washing, they were incubated in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol (30 minutes, room temperature) to quench endogenous peroxidase activity, then extensive rinsing was followed by blocking in 5% normal goat serum in PBS- 0.5% Triton X100 before incubation in monoclonal rat anti-BrdU antibody (1/500, Abcam) for 24 hours at room temperature. After several washes, sections were incubated with biotinylated rabbit anti-rat (1/500, Vector Laboratories; 2 hours, room temperature) followed by 30 minutes with avidin–biotin–peroxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and staining development at room temperature with 3,3'-diaminobenzidine (Vectastain ABC kit and DAB kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

BrdU-positive (BrdU<sup>+</sup>) cells were quantified in the granule cell layer (GCL), including the subgranular zone (defined as a 2-cell-body-wide zone bordering the GCL and the hilus) of the dorsal DG. Counting was performed through the entire section thickness (40× objective) in every fifth section (50  $\mu$ m thick, 250  $\mu$ m apart) spanning –0.94 mm (first section) to –2.18 mm from the Bregma (5 sections per mouse). The fifth section was lost for 2 young mice. The experimenter was blind to treatment, but the age of the mouse could easily be guessed. The GCL area was measured for each section with ImageJ software on DG images captured with the 4× objective of an Olympus AHB3 microscope (Schneider et al., 2012). GCL volume for each section was obtained by multiplying total GCL area (left GCL + right GCL) by section thickness (50  $\mu$ m). For each mouse, BrdU<sup>+</sup> cell density was calculated by dividing total BrdU<sup>+</sup> cell count by the total volume of GCL screened.

### 2.5. Statistical analyses

Discrimination and navigation performances were analyzed on 1-way analysis of variance (group) with repeated measures on 1 or more factors (Distance, Distance Category, Day, Object, and oOrder), followed by post hoc Newman–Keuls (NK) test. The performance of each group on each task was compared to chance on Student *t* test. The Spearman rank correlation test was used to check whether sampling exploration or BrdU<sup>+</sup> cell density correlated with PS performance. A Student *t* test was used in the last experiment to compare BrdU<sup>+</sup> cell densities between age groups. Differences were considered significant at *p* < 0.05. Data are given as mean  $\pm$  standard error of the mean.

## 3. Results

### 3.1. Minimal object displacement detected by 6-month-old mice

After a 2-day familiarization period, 2 groups of 6-month-old mice were tested on one of each distance category (short, medium, or long) over 3 days (group A: 10, 20, and 30 cm, *n* = 13; group B: 15, 25, and 35 cm, *n* = 16, Fig. 1A). The order of the 3 distance categories was counterbalanced over groups and days.

Globally, group B explored objects (20.9  $\pm$  0.9 seconds) slightly less than group A (25.0  $\pm$  1.4 seconds) during the 12-minute sample trial [*F*(1,27) = 5.63, *p* = 0.025, with no effect of Distance Category or Distance Category  $\times$  Group interaction). The apparent significant difference seems to have been due to an outlier: when 1 mouse (group A) with very long sampling time (60.1 seconds) is removed from analysis, the group effect is no longer significant.

During the test trial, preference for the displaced object increased as a function of Distance Category (*F*(2,54) = 43.88, *p* < 0.0001, with no Group effect or interaction with Distance Category; Fig. 1B). Both groups detected changes for medium and long distances only (from 20 cm onward). The intermediate level of 20-cm performance indicated that discrimination was particularly challenging at this distance, which was therefore subsequently

used to test spatial PS performance. The amount of object exploration during the sampling trial did not influence subsequent performance on the medium Distance Category (Spearman rank test. group A:  $\rho = -0.42$ ,  $z = 1.45$ ,  $p = 0.15$ ; group B:  $\rho = -0.40$ ,  $z = 1.56$ ,  $p = 0.12$ ). Performances were not sensitive to the Order of Distance Categories (Group  $\times$  Distance Category  $\times$  Order:  $F(10,34) = 0.29$ ,  $p > 0.10$ ; no effect of Order or interaction with Order; data not shown).

3.2. Spatial pattern separation performance in 20-month-old mice

After a 2-day habituation period, a new batch of 6- and 20-month-old mice ( $n = 7/\text{group}$ ) were tested at the shortest, longest, and most challenging distances (10, 35, and 20 cm, respectively; Fig. 2A) in pseudorandomized order over a 3-day period. As old mice often show short exploration times, the sample trial was increased from 12 to 15 minutes for all the following experiments.

Despite the extended duration, old mice explored less than young ones during sampling for all distances (young:  $45.1 \pm 2.5$  seconds; old:  $31.1 \pm 2.3$  seconds; Age effect:  $F(1,24) = 15.53$ ,  $p = 0.002$ ; no Distance effect or interaction with Age).

During the test trial, performances on the 3 distances varied as a function of age (Age  $\times$  Distance:  $F(2,24) = 3.58$ ,  $p = 0.04$ ; Distance effect:  $F(2,24) = 10.1$ ,  $p = 0.0007$ ; and no Age effect:  $F(1,24) = 1.06$ ,  $p = 0.32$ ; Fig. 2B). Both groups did not detect the 10-cm displacement but easily detected the 35-cm displacement. At the challenging 20-cm distance, younger mice performed very well (NK post hoc:  $p < 0.05$  10-cm vs. 20-cm distance), whereas old mice

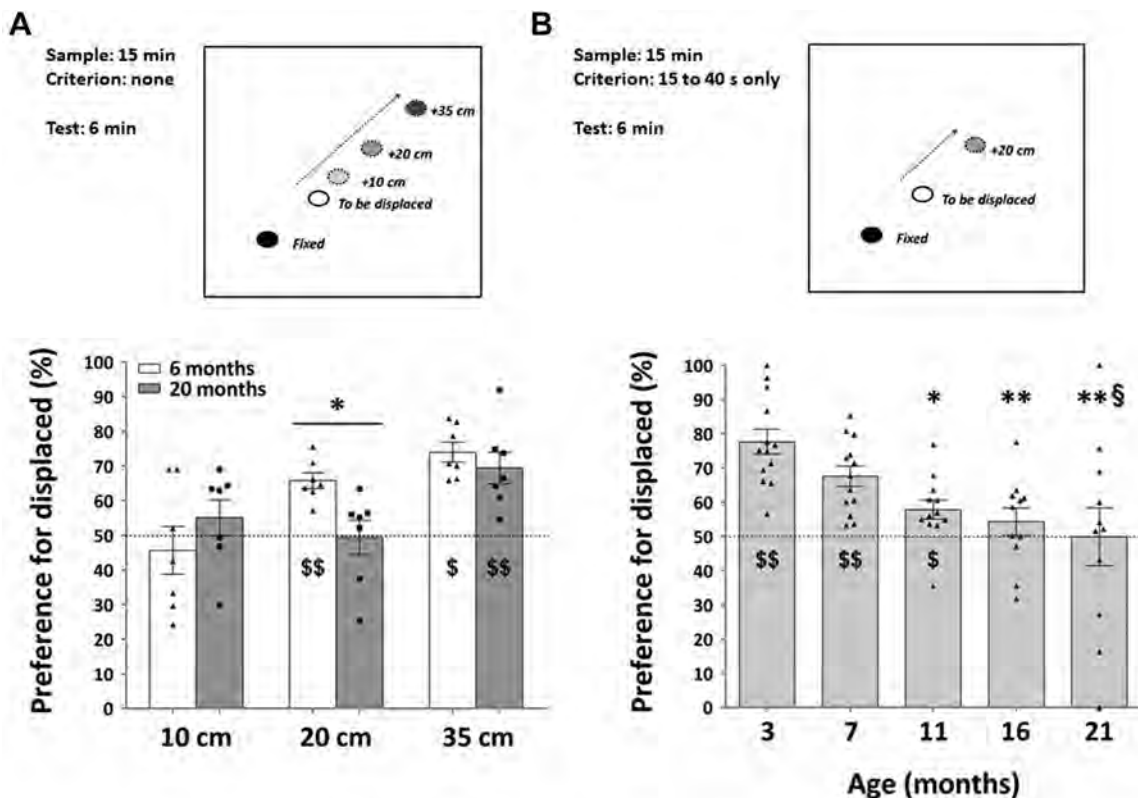
performed close to chance level and very poorly compared to young mice (NK post hoc:  $p < 0.05$  young vs. old at 20-cm distance, not significant at 10- and 35-cm distances). There was no significant correlation between sampling exploration and 20-cm performance (Spearman rank test. All mice:  $\rho = 0.25$ ,  $z = 0.91$ ,  $p = 0.36$ ; young mice:  $\rho = -0.25$ ,  $z = 0.61$ ,  $p = 0.54$ ; and old mice:  $\rho = -0.71$ ,  $z = 1.75$ ,  $p = 0.08$ ).

After a 7-day rest period, the spatial navigation performance of the same mice was determined in a Barnes maze task. Old mice performed as well as young mice during the training phase (Fig. S1A) and the 28-day delayed probe test (Fig. S1B).

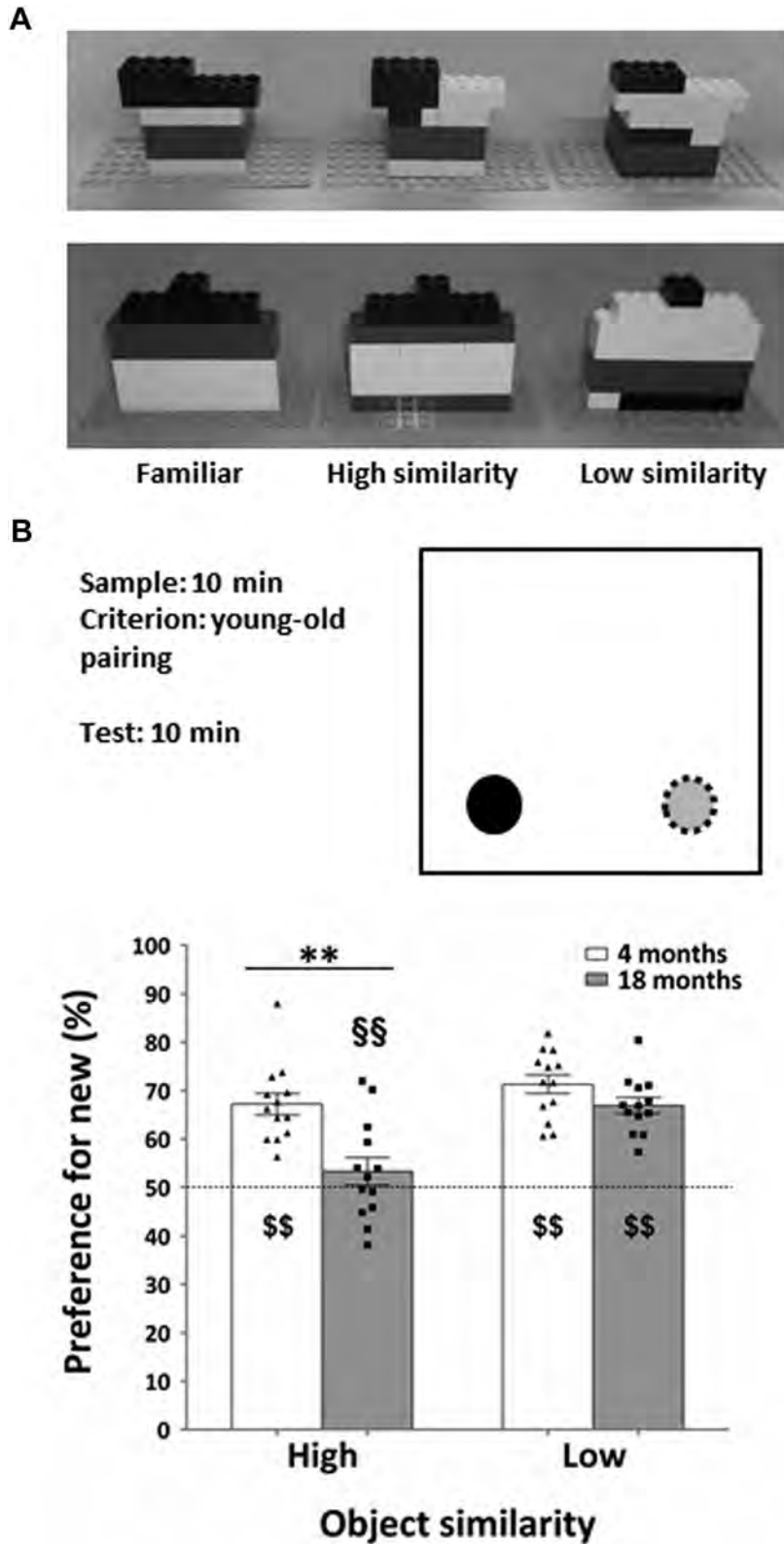
3.3. Age-dependent evolution of spatial pattern separation performance

The aforementioned results suggested that spatial PS performance was affected by normal aging. We therefore characterized age-related changes in 20-cm performance using groups of different ages: 3, 7, 11, 16, and 21 months (Fig. 2B).

To limit a possible impact of age-dependent variation in sampling exploration on subsequent discrimination performance (as noted previously), mice exploring less than 15 seconds or more than 40 seconds during the 15-minute sampling trial were discarded from the data set (1 < 15 seconds at 3 months, final  $n = 13$ , sampling exploration:  $25.6 \pm 2.5$  seconds; 2 > 40 seconds at 7 months, final  $n = 13$ , sampling exploration:  $29.8 \pm 1.8$  seconds; 2 > 40 seconds at 11 months, final  $n = 12$ , sampling exploration:  $29.1 \pm 2.1$  seconds; 2 < 15 seconds at 16 months, final  $n = 11$ , sampling exploration:



**Fig. 2.** Age effect on behavioral novelty responses to object displacements in C57BL/6j mice. (A) Performances of 6- and 20-month-old mice on 10, 20, and 35 cm displacement distances. Aged mice were impaired on the challenging 20-cm distance compared to young mice (NK post hoc test:  $*p < 0.05$ ). (B) Performances of independent groups of mice tested on the 20-cm distance at the ages of 3, 7, 11, 16, and 21 months (NK post hoc test:  $*p < 0.05$  and  $**p < 0.01$  versus the 3-month-old group;  $\$p < 0.05$  versus the 7-month-old group). Data are shown as mean ( $\pm$ standard error of the mean) percentage time spent exploring the displaced object during the first 3 minutes of the test trial. Student  $t$  test for both graphs:  $\$p < 0.05$  and  $$$p < 0.001$  versus 50% chance level.



**Fig. 3.** Age effect on object pattern separation performance in C57BL/6J mice. (A) Pictures of the 2 sets of familiar objects with corresponding high- and low-similarity objects. (B) Performance of 4- and 18-month-old mice for new objects with high and low similarities with the familiar object. Data are shown as mean ( $\pm$  standard error of the mean) percentage time spent exploring the new object during the 10-minute test trial. Newman–Keuls post hoc test: \*\* $p < 0.0005$  aged group versus young group; \$\$ $p < 0.0005$  versus performance on low-similarity trial. Student  $t$  test: \$ $p < 0.0001$  versus 50% chance level.



22.2 ± 1.0 seconds; 3 < 15 seconds, and 1 > 40 seconds at 21 months, final n = 11, sampling exploration: 27.2 ± 1.9 seconds). There was no significant difference in sampling exploration between the groups ( $F(4,55) = 2.29, p = 0.071$ ).

During the test trial, performance was significantly affected by age ( $F(4,55) = 5.92, p = 0.0005$ ). The deficit appeared around middle age, as the 3-month-old group outperformed all groups aged 11 months and over. At the ages of 16 and 21 months, mice performed close to chance level. There was no significant correlation between sampling exploration and PS performance (Spearman rank test. All groups:  $\rho = -0.14, z = 1.11, p = 0.26$ , each individual group:  $-0.59 \leq \rho \leq 0.05, z \leq 1.87, p > 0.05$ ).

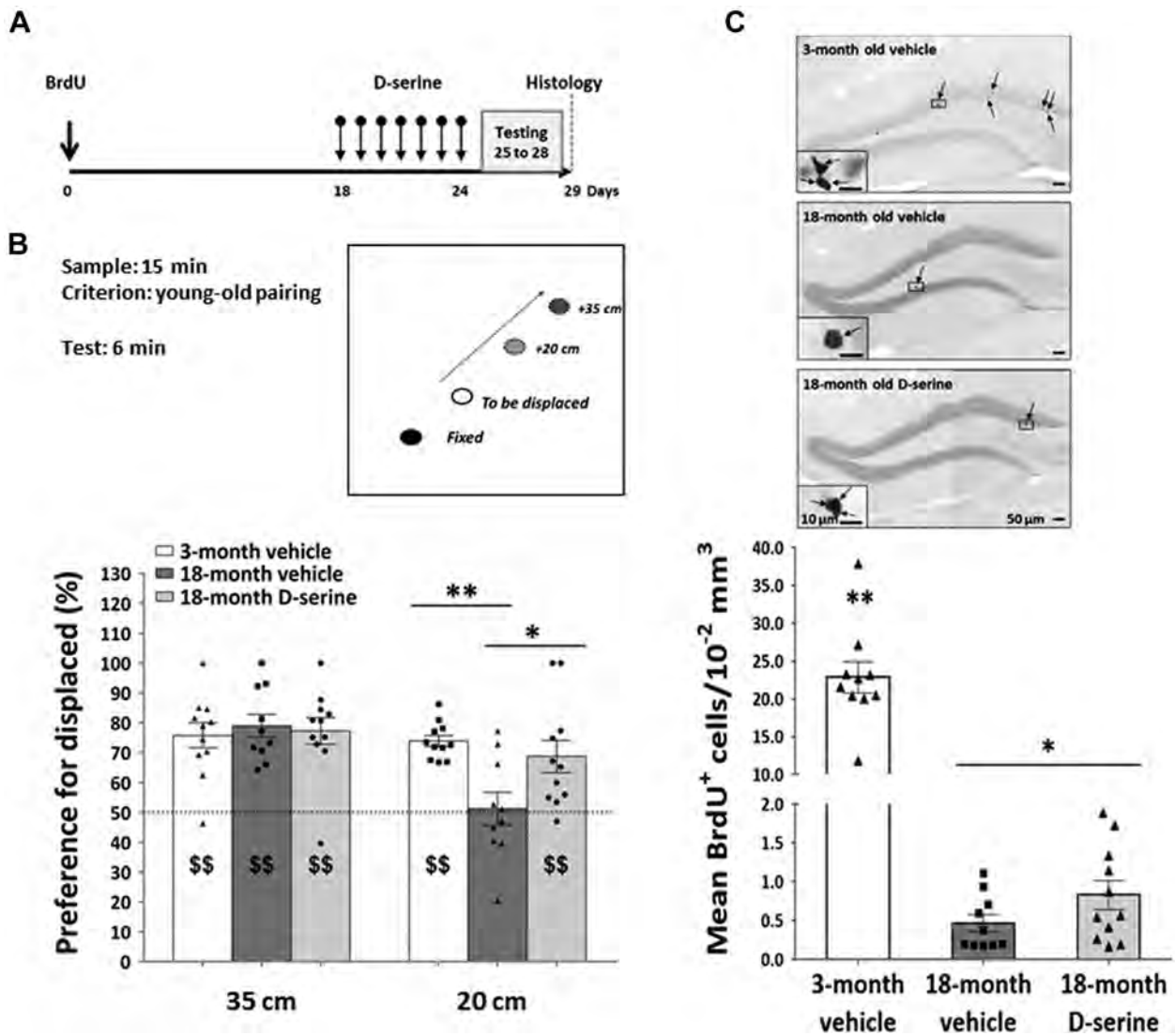
After a 7-day rest period, subgroups of the 7- and 21-month-old mice tested previously were submitted to a classical version of the spatial water-maze task; older mice performed as well as younger ones during the training (Fig. S1C) and 7-day delayed probe test (Fig. S1D).

### 3.4. Object pattern separation performance in 18-month-old mice

As aging appeared to affect spatial PS performance, we tested young and old mice (4 and 18 months old, n = 13/group) in a different task designed to evaluate object PS performances using 2 sets of objects with different levels of similarity (Fig. 3A).

The 15–40 seconds criterion used previously still left some doubt as to a possible impact of age-dependent variation in sampling exploration on subsequent PS performance. Each old mouse was therefore paired with a young one, so that the sample trial of the young mouse was terminated after 10 minutes or when it reached the total object exploration time performed by the paired old mouse during the 10-minute sampling trial (young mice: 9.0 ± 0.5 seconds; old mice: 9.4 ± 0.6 seconds; Age × Day:  $F(1, 24) = 0.03, p > 0.10$ ; no effect of Age or Day).

During the test trial, object discrimination performances were globally affected by age ( $F(1,24) = 13.0, p < 0.002$ ) and object



**Fig. 4.** Effects of D-serine on novelty detection performance in 18-month-old C57BL/6j mice. (A) Daily D-serine or vehicle treatment was applied 18–24 days after BrdU injection and before the 4-day behavioral test period. (B) Performances were first determined on the easy 35-cm distance and then on the challenging 20-cm distance in 3-month-old mice treated with vehicle and in 18-month-old mice treated with vehicle or D-serine (50 mg/kg, IP). Data are shown as mean (± standard error of the mean [SEM]) percentage time spent exploring the displaced object during the first 3 minutes of the test trial. Newman–Keuls post hoc test: \* $p < 0.05$  versus 18-month D-serine group, \*\* $p < 0.01$  versus 3-month vehicle group. Student  $t$  test:  $^{ss}p < 0.001$  versus 50% chance level. (C) Representative micrographs of 1 section immunostained for BrdU for each group ( $\times 10$  for micrographs,  $\times 40$  for inserts). The graph shows the effect of D-serine on the mean (±SEM) 4-week-old BrdU<sup>+</sup> cell count per  $10^{-2} \text{ mm}^3$  GCL volume for each group. This particular scale was chosen as mean GCL volume per section was  $1.09 \pm 0.03 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^3$ . \* $p < 0.05$  versus 18-month vehicle group. \*\* $p < 0.01$  versus each 18-month group.

similarity ( $F(1,24) = 22.83, p < 0.0001$ ). More importantly, the age effect on performance depended on the level of similarity of the novel object (Age  $\times$  Object:  $F(1,24) = 6.52, p < 0.02$ ) (Fig. 3B). Young mice showed a significant preference for the novel object, whatever its level of similarity with the familiar one; old mice discriminated novel objects with low similarity as well as young mice, but their performance dropped to chance level for objects with high similarity.

In general, levels of performance appeared slightly lower in the object task than those in the spatial task. In the object PS task, it rapidly became clear that making stepwise changes in Lego arrangements was less straightforward than changing the distance between 2 objects: mice showed more graded reactions in relation to graded spatial changes. Therefore, D-serine was tested in the more flexible spatial PS task, to increase the chance of detecting beneficial effects in aged mice.

### 3.5. Effect of D-serine on spatial pattern separation performance in 18-month-old mice

The effects of D-serine were tested in 18-month-old mice as Wu et al. (2015) showed that complete rescue of PS performance was possible at this age. Daily injections of D-serine (50 mg/kg, IP) or vehicle were given during the week preceding behavioral testing (Fig. 4A). Groups were constituted of 3-month-old mice treated with vehicle ( $n = 11$ ) and 18-month-old mice treated with vehicle or D-serine ( $n = 11/\text{group}$ ). The group of 3-month-old mice was used as an internal control for task reliability in case D-serine had no effect and also to compare the performance of the 2 older groups against an optimal level of performance (see Fig. 2B). One old vehicle-treated mouse was eliminated as it did not explore the objects. During the second day of habituation, mice were tested on a 0-cm distance test to improve familiarization with the test schedule and to check that they would explore both objects equally when there was no change (young vehicle:  $48.2 \pm 4.0\%$ ; old vehicle:  $44.6 \pm 2.6\%$ ; old D-serine:  $48.9 \pm 2.8\%$ ;  $F(2, 29) = 0.51, p > 0.10$ ). The next 2 days, mice were tested on the easy 35-cm distance and then the challenging 20-cm distance (Fig. 4B).

The young/old pairing procedure applied to the young and old vehicle-treated groups was again successful in minimizing the effect of age on total exploration during the sample trials (young vehicle:  $22.6 \pm 0.8$  seconds; old vehicle:  $21.7 \pm 1.1$  seconds; old D-serine:  $24.1 \pm 0.9$  seconds;  $F(2, 29) = 1.66, p > 0.10$ ; Group  $\times$  Day interaction:  $F(4, 58) = 1.14, p > 0.10$ ).

D-serine had no effect on the high performances obtained in the 35-cm distance test (Group:  $F(2,29) = 0.14, p > 0.10$ ). On the challenging 20-cm distance, there was a significant effect of group ( $F(2,29) = 6.80, p < 0.004$ ). D-serine-treated old mice performed nearly as well as young vehicle-treated mice, and both groups performed significantly better than vehicle-treated old mice. The severe deficit in the latter group was not related to sample exploration (Spearman rank test.  $P = 0.18, z = 0.53, p = 0.60$ ; all groups:  $\rho = 0.15, z = 0.86, p = 0.39$ ).

As a first approach to identify 1 possible mechanism involved in the beneficial effect of D-serine, we analyzed the impact of treatment on the survival of 4-week-old GCL cells in all mice (except for 1 young mouse, due to technical problems). As classically found, younger mice had higher mean BrdU<sup>+</sup> cell density than vehicle- or D-serine-treated older mice ( $F(2, 28) = 118.69, p < 0.0001$ , Fig. 4C). When only aged groups were considered, there was a small increase in BrdU<sup>+</sup> cells in the D-serine group that just reached significance ( $t = 2.14, df = 19, p = 0.046$ ). There was no correlation between PS performance and BrdU<sup>+</sup> cell density in young vehicle-treated mice, but we found an intriguing negative correlation for each aged group (Spearman rank test. 3-month vehicle:  $\rho = -0.08, z = 0.24,$

$p = 0.81$ ; 18-month vehicle:  $\rho = -0.71, z = 2.16, p = 0.031$ ; 18-month D-serine:  $\rho = -0.63, z = 2.00, p = 0.046$ ).

## 4. Discussion

The main aim of the present study was to characterize the effect of aging on PS performance in C57BL/6J male mice. We first designed 2 PS tasks, as close as possible to those used in humans. These tasks were based on behavioral detection of subtle changes in object features and in spatial location of an object. We showed that (1) PS performance was severely impaired in object and in spatial tasks at the age of 18 months; (2) spatial PS performance gradually declined between the ages of 3 and 21 months, with a significant deficit already detected at the age of 11 months; and (3) D-serine treatment fully rescued the performance of 18-month-old mice in the spatial PS task.

Before further discussing our results, it is necessary to consider whether the PS performance deficits of the older mice were due to impaired cognition or to noncognitive age-related alterations. First, it should be noted that PS performance deficit was still found in older mice after controlling for age-related decrease in sample exploration, either globally or individually across ages. Age-dependent decrease in motivation for novelty-driven object exploration is unlikely to have contributed, as young and aged groups were equally efficient in low-similarity trials on both object and spatial tasks. In addition, aged mice performed very similarly to young mice in the 2 spatial navigation tasks, especially in the water-maze task, which was shown by Yassine et al. (2013) to be critically dependent on vision. The same study showed that 21-month-old blind mice from a mixed SJL (blind) and C57BL/6 genetic background performed efficiently in an object location task and in an object recognition task using objects of different shapes. Thus, subtle changes in the visual capacities of our aged mice may have marginally contributed to their deficits in the object PS task but are very unlikely to be responsible for deficits in the spatial PS task. Finally, the clear improvement in spatial PS performance obtained with D-serine treatment, without affecting other behavioral measures such as sample exploration, also pleads in favor of a cognitive deficit. Thus, age-related impairment in PS performance appears to be mainly due to altered cognitive processing rather than defects in gross sensorimotor, visual or motivational aspects of the task.

To the best of our knowledge, this is the first study in a single animal model to show the deleterious effect of aging on PS ability for both object location and object features, as reported in humans (Reagh et al., 2014; Stark et al., 2013). Deficits in spatial PS performance in aged rodents mainly affect tasks based on place learning in a maze and object location discrimination learning in a touch screen paradigm (Creer et al., 2010; Gracian et al., 2013). Deficits in object PS performance were previously reported in aged monkeys performing an object discrimination learning task and in aged rats performing a learning task or a 2-trial task similar to ours (Burke et al., 2011; Gámiz and Gallo, 2012; Johnson et al., 2017).

The present study also uniquely characterized the progression of spatial PS performance in mice throughout adulthood (from 3 to 21 months). Deficits were already significant at the age of 11 months, and the 21-month-old group performed at chance level. Interestingly, learning and memory performance in the Barnes maze and Morris water-maze tasks were spared in aged mice that were nevertheless severely impaired in the spatial PS task. The spatial PS task is quite different from spatial navigation tasks, which rely on extensive training and strong motivation to navigate toward a goal to escape from water or bright light; moreover, multiple training trials may allow older mice to learn the goal location as accurately as younger mice by the end of spatial navigation training. We concluded that these spatial navigation tasks were not sensitive

enough to be affected by subtle age-related alterations such as those detected in the spatial PS task. Conversely, spatial PS abilities may not be essential for successful navigation based on easily identifiable distal cues (Imielski et al., 2012; McHugh et al., 2007). Taken together, the present results highlight the exceptional sensitivity of our spatial PS task to aging in C57BL/6J mice. It is noteworthy that the gradual decline in performance during mouse adulthood was reminiscent of that reported in humans from the ages of 20–89 years (see Fig. 2B in Stark et al., 2013). This striking similarity suggests a high degree of translational validity of our mouse model, and confirms the hypothesis of common age-dependent alterations in the mechanisms underlying PS across species (Burke et al., 2011).

Human functional magnetic resonance imaging studies have repeatedly shown an involvement of the DG-CA3 region in PS tasks taxing domains as different as object features and object location, as well as temporal or environmental information (Azab et al., 2014; Bakker et al., 2008; Kyle et al., 2015; Lacy et al., 2010; Reagh et al., 2014). More recently, it was suggested that interference resolution capacity increases while domain selectivity decreases as information proceeds along the ventral “object” stream (perirhinal cortex, lateral entorhinal cortex) and the dorsal “spatial” stream (parahippocampal cortex, medial entorhinal cortex), both of which provide major input to the DG (Reagh and Yassa, 2014). In other words, upstream medial temporal lobe cortices may contribute to specific aspects of discrimination processes, whereas the downstream DG-CA3 region may separate more multidimensional representations. This hypothesis could shed some light on a long-lasting debate in animal studies concerning the structure or structures involved in object PS ability. Several studies in rats showed that an intact perirhinal cortex was required to discriminate objects with overlapping features (Bussey et al., 2005; Bartko et al., 2007; but see; Hales et al., 2015). Alternatively, interruption of object-related information flow along the ventral stream by perirhinal lesions may affect further steps in object discrimination processing. It is noteworthy that, to the best of our knowledge, only 1 animal study explored (and supported) the role of adult DG neurogenesis in an object PS task (Bolz et al., 2015). Thus, object PS deficits in aged animals have so far been mainly attributed to the deterioration of perirhinal functionality (Burke et al., 2011, 2012, 2014).

On the other hand, animal studies focusing on spatial and contextual aspects of PS ability are generally in favor of a key role of the dorsal DG and an involvement of local adult neurogenesis (e.g., Deng et al., 2013; Gilbert et al., 2001; Goodrich-Hunsaker et al., 2008; Sahay et al., 2011). The production of new DG neurons is known to decrease markedly with age (e.g., Ben Abdallah et al., 2010; Morgenstern et al., 2008). Our 18-month-old mice showed a much lower proportion of BrdU+ cells in the DG than 3-month-old counterparts. As stereological methods were not used here, it is possible that age-related volumetric changes in the DG could have contributed to this large age-related difference in BrdU+ cell density. Voluntary exercise was repeatedly reported to boost both neurogenesis and PS performance in young adult mice (Bolz et al., 2015; Creer et al., 2010). As further discussed in the following, the relationship between neurogenesis and PS performance may be affected by aging or put into question, as exercise does not necessarily improve both performance and neurogenesis in aged mice (Creer et al., 2010; Wu et al., 2015). The scarcity of studies investigating this issue in aged animal models emphasizes our limited knowledge of the neuronal changes underlying age-related deficits in PS performance.

D-serine is considered to be a promising therapeutic approach, with minimal side effects, for age-related cognitive decline (Mothet et al., 2015). In the present study, 1 week’s pharmacological

treatment with D-serine completely reversed the deficits of 18-month-old mice in the spatial PS task. This finding is in agreement with an important role of dentate NMDAR in PS performance and in the maturation of young adult-born neurons (Kannangara et al., 2014; Kheirbek et al., 2012; McHugh et al., 2007; Sultan et al., 2013). As shown by Tashiro et al. (2006), activation of dentate NMDAR was also necessary for young neuron survival around 18 days after birth, a critical period covered by the D-serine treatment initiated 18 days after BrdU injection. Nevertheless, aged mice treated with D-serine showed a modest increase in the number of 4-week-old BrdU+ cells in their dorsal GCL, which remained much lower than found in young mice. On the other hand, the D-serine-treated mice performed nearly as well as young mice in the spatial PS task. These findings do not support a simple quantitative relationship between number of 4-week-old GCL cells and PS performance. Moreover, the negative correlation between BrdU+ cell density and spatial PS performance, specifically found in aged mice, appeared rather counterintuitive in this regard. This intriguing result should be confirmed by more detailed investigation of neurogenesis (e.g., phenotyping BrdU+ cells and stereology). On the other hand, similar small increases in neurogenesis induced by other neurogenic treatments have been shown to improve other aspects of cognition in aged rodents (Gibbons et al., 2014; Pardo et al., 2016). Thus, a small increase in the number of dentate cells may trigger large-scale experience-dependent changes downstream the hippocampal network, due to the large impact of sparse dentate cell firing on the activity of CA3 pyramidal cells (Rebola et al., 2017). Alternatively, D-serine may have improved spatial PS performance by acting on the excitability and/or morphology of adult-born DG cells. Taken together, the present results suggest that the link between neurogenesis and PS performance, if any, is far more complicated than the current “the more the better” hypothesis (see also Wu et al., 2015). Therefore, alternative targets must be also considered for the behavioral effect of D-serine, especially since chronic systemic administration is expected to induce a long-lasting increase in whole-brain D-serine contents (Bado et al., 2011). One possibility is that its beneficial effects may be mediated through NMDARs of other DG cells, or an upstream medial temporal lobe structure such as the entorhinal cortex. As a more specific approach, stimulation of local production and/or release of endogenous D-serine within the suspected structure of aged mice, with subsequent testing on the spatial PS task, could help resolve this anatomic issue.

In conclusion, the present study showed that aged mice were severely impaired in both object and spatial PS tasks and that spatial PS deficits, which appear gradually as a function of age, can be reversed by a subchronic D-serine treatment. Our model of age-related deficits in 2 different PS tasks has the advantage of imposing minimal constraints on (aged) animal welfare. The model should be very helpful in identifying the specific changes in the medial temporal lobe, which impair PS performance. Improving our knowledge on such issues is of even broader interest, since impairment in PS ability has been suggested to contribute to episodic memory deficit in normal and pathological aging, and in other human brain disorders (Bakker et al., 2012; Das et al., 2014; Déry et al., 2015; Stark et al., 2013).

#### Disclosure statement

The authors have no actual or potential conflicts of interest to disclose.

#### Acknowledgements

The authors thank Anne-Sophie Wilding for preliminary tests useful to this project and Olivier Bildstein and Georges Egesi for



taking care of our young and aged mice. This work was supported by the RMT-TMO Offensive Science initiative, INTERREG IV Upper Rhine program (EU-funded project (ERDF) # A29 “Neurogenesis and Neuroprotection”), the France Alzheimer Association (APP SM 2014 # 104, Groupe Intérieure), Neurex (Young Investigator Grant 2013–2014), the University of Strasbourg (basic funding), and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS; basic funding). All these funding sources had no involvement in any aspect of the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the article for publication.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.013>.

## References

- Avellar, M., Scoriels, L., Madeira, C., Vargas-Lopes, C., Marques, P., Dantas, C., Manhães, A.C., Leite, H., Panizzutti, R., 2016. The effect of D-serine administration on cognition and mood in older adults. *Oncotarget* 7, 11881–11888.
- Azab, M., Stark, S.M., Stark, C.E., 2014. Contributions of human hippocampal subfields to spatial and temporal pattern separation. *Hippocampus* 24, 293–302.
- Bado, P., Madeira, C., Vargas-Lopes, C., Moulin, T.C., Wasilewska-Sampaio, A.P., Maretti, L., de Oliveira, R.V., Amaral, O.B., Panizzutti, R., 2011. Effects of low-dose D-serine on recognition and working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 218, 461–470.
- Bakker, A., Kirwan, C.B., Miller, M., Stark, C.E., 2008. Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science* 319, 1640–1642.
- Bakker, A., Krauss, G.L., Albert, M.S., Speck, C.L., Jones, L.R., Stark, C.E., Yassa, M.A., Bassett, S.S., Shelton, A.L., Gallagher, M., 2012. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron* 74, 467–474.
- Bartko, S.J., Winters, B.D., Cowell, R.A., Saksida, L.M., Bussey, T.J., 2007. Perirhinal cortex resolves feature ambiguity in configural object recognition and perceptual oddity tasks. *Learn Mem.* 14, 821–832.
- Becker, S., 2016. Neurogenesis and pattern separation: time for a divorce. *Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci.* 8.
- Ben Abdallah, N.M., Slomianka, L., Vyssotski, A.L., Lipp, H.P., 2010. Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiol. Aging* 31, 151–161.
- Bolz, L., Heigele, S., Bischofberger, J., 2015. Running improves pattern separation during novel object recognition. *Brain Plast.* 1, 129–141.
- Burke, S.N., Hartzell, A.L., Lister, J.P., Hoang, L.T., Barnes, C.A., 2012. Layer V perirhinal cortical ensemble activity during object exploration: a comparison between young and aged rats. *Hippocampus* 22, 2080–2093.
- Burke, S.N., Maurer, A.P., Nematollahi, S., Uprety, A., Wallace, J.L., Barnes, C.A., 2014. Advanced age dissociates dual functions of the perirhinal cortex. *J. Neurosci.* 34, 467–480.
- Burke, S.N., Wallace, J.L., Hartzell, A.L., Nematollahi, S., Plange, K., Barnes, C.A., 2011. Age-associated deficits in pattern separation functions of the perirhinal cortex: a cross-species consensus. *Behav. Neurosci.* 125, 836–847.
- Bussey, T.J., Saksida, L.M., Murray, E.A., 2005. The perceptual-mnemonic/feature conjunction model of perirhinal cortex function. *Q. J. Exp. Psychol. B* 58, 269–282.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson Jr., G.D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., Bussey, T.J., 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210–213.
- Conway, M.A., 2009. Episodic memories. *Neuropsychologia* 47, 2305–2313.
- Creer, D.J., Romberg, C., Saksida, L.M., van Praag, H., Bussey, T.J., 2010. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2367–2372.
- Das, T., Ivleva, E.I., Wagner, A.D., Stark, C.E., Tamminga, C.A., 2014. Loss of pattern separation performance in schizophrenia suggests dentate gyrus dysfunction. *Schizophr. Res.* 159, 193–197.
- Deng, W., Mayford, M., Gage, F.H., 2013. Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *Elife* 2, e00312.
- Déry, N., Goldstein, A., Becker, S., 2015. A role for adult hippocampal neurogenesis at multiple time scales: a study of recent and remote memory in humans. *Behav. Neurosci.* 129, 435–449.
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59.
- Ennaceur, A., Neave, N., Aggleton, J.P., 1997. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp. Brain Res.* 113, 509–519.
- Filali, M., Lalonde, R., 2013. The effects of subchronic D-serine on left-right discrimination learning, social interaction, and exploratory activity in APPsw/PS1 mice. *Eur. J. Pharmacol.* 701, 152–158.
- Gámiz, F., Gallo, M., 2012. Spontaneous object recognition memory in aged rats: complexity versus similarity. *Learn. Mem.* 19, 444–448.
- Gibbons, T.E., Pence, B.D., Petr, G., Ossyria, J.M., Mach, H.C., Bhattacharya, T.K., Perez, S., Martin, S.A., McCusker, R.H., Kelley, K.W., Rhodes, J.S., Johnson, R.W., Woods, J.A., 2014. Voluntary wheel running, but not a diet containing (-)-epigallocatechin-3-gallate and  $\beta$ -alanine, improves learning, memory and hippocampal neurogenesis in aged mice. *Behav. Brain Res.* 272, 131–140.
- Gilbert, P.E., Kesner, R.P., Lee, I., 2001. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11, 626–636.
- Goodrich-Hunsaker, N.J., Hunsaker, M.R., Kesner, R.P., 2008. The interactions and dissociations of the dorsal hippocampus subregions: how the dentate gyrus, CA3, and CA1 process spatial information. *Behav. Neurosci.* 122, 16–26.
- Gracian, E.L., Shelley, L.E., Morris, A.M., Gilbert, P.E., 2013. Age-related changes in place learning for adjacent and separate locations. *Neurobiol. Aging* 34, 2304–2309.
- Greenberg, G.D., Howerton, C.L., Trainor, B.C., 2014. Fighting in the home cage: agonistic encounters and effects on neurobiological markers within the social decision-making network of house mice (*Mus musculus*). *Neurosci. Lett.* 566, 151–155.
- Hales, J.B., Broadbent, N.J., Velu, P.D., Squire, L.R., Clark, R.E., 2015. Hippocampus, perirhinal cortex, and complex visual discriminations in rats and humans. *Learn. Mem.* 22, 83–91.
- Imielski, Y., Schwamborn, J.C., Lüningschrör, P., Heimann, P., Holzberg, M., Werner, H., Leske, O., Püschel, A.W., Memet, S., Heumann, R., Israel, A., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., 2012. Regrowing the adult brain: NF- $\kappa$ B controls functional circuit formation and tissue homeostasis in the dentate gyrus. *PLoS One* 7, e30838.
- Groves, J.O., Leslie, I., Huang, G.J., McHugh, S.B., Taylor, A., Mott, R., Munafò, M., Bannerman, D.M., Flint, J., 2013. Ablating adult neurogenesis in the rat has no effect on spatial processing: evidence from a novel pharmacogenetic model. *PLoS Genet.* 9, e1003718.
- Johnson, S.A., Turner, S.M., Santacrose, L.A., Carty, K.N., Shafiq, L., Bizon, J.L., Maurer, A.P., Burke, S.N., 2017. Rodent age-related impairments in discriminating perceptually similar objects parallel those observed in humans. *Hippocampus* 27, 759–776.
- Kannagara, T.S., Bostrom, C.A., Ratzlaff, A., Thompson, L., Cater, R.M., Gil-Mohapel, J., Christie, B.R., 2014. Deletion of the NMDA receptor GluN2A subunit significantly decreases dendritic growth in maturing dentate granule neurons. *PLoS One* 9, e103155.
- Kheirbek, M.A., Tannenholz, L., Hen, R., 2012. NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. *J. Neurosci.* 32, 8696–8702.
- Kyle, C.T., Stokes, J.D., Lieberman, J.S., Hassan, A.S., Ekstrom, A.D., 2015. Successful retrieval of competing spatial environments in humans involves hippocampal pattern separation mechanisms. *Elife* 27, 4.
- Lacy, J.W., Yassa, M.A., Stark, S.M., Muftuler, L.T., Stark, C.E., 2010. Distinct pattern separation related transfer functions in human CA3/dentate and CA1 revealed using high-resolution fMRI and variable mnemonic similarity. *Learn. Mem.* 18, 15–18.
- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Moser, M.B., Moser, E.I., 2007. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* 315, 961–966.
- Levin, R., Dor-Abarbanel, A.E., Edelman, S., Durrant, A.R., Hashimoto, K., Javitt, D.C., Heresco-Levy, U., 2015. Behavioral and cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist D-serine in healthy humans: initial findings. *J. Psychiatr. Res.* 61, 188–195.
- Marr, D., 1971. Simple memory: a theory for archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 262, 23–81.
- Marrone, D.F., Adams, A.A., Satvat, E., 2011. Increased pattern separation in the aged fascia dentata. *Neurobiol. Aging* 32, 2317–2332.e23.
- McHugh, T.J., Jones, M.W., Quinn, J.J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J.K., Lowell, B.B., Fanselow, M.S., Wilson, M.A., Tonegawa, S., 2007. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* 317, 94–99.
- Moreau, P.H., Cosquer, B., Jeltsch, H., Cassel, J.C., Mathis, C., 2008. Neuroanatomical and behavioral effects of a novel version of the cholinergic immunotoxin mu p75-saporin in mice. *Hippocampus* 18, 610–622.
- Mothet, J.P., Le Bail, M., Billard, J.M., 2015. Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. *J. Neurochem.* 135, 210–225.
- Morgenstern, N.A., Lombardi, G., Schinder, A.F., 2008. Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. *J. Physiol.* 586, 3751–3757.
- Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Rodriguez Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., Fanselow, M.S., Tonegawa, S., 2012. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149, 188–201.
- Pardo, J., Uriarte, M., Cónsole, G.M., Reggiani, P.C., Outeiro, T.F., Morel, G.R., Goya, R.G., 2016. Insulin-like growth factor-1 gene therapy increases hippocampal neurogenesis, astrocyte branching and improves spatial memory in female aging rats. *Eur. J. Neurosci.* 44, 2120–2128.
- Reagh, Z.M., Yassa, M.A., 2014. Object and spatial mnemonic interference differentially engage lateral and medial entorhinal cortex in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4264–E4273.

- Reagh, Z.M., Roberts, J.M., Ly, M., DiProspero, N., Murray, E., Yassa, M.A., 2014. Spatial discrimination deficits as a function of mnemonic interference in aged adults with and without memory impairment. *Hippocampus* 24, 303–314.
- Rebola, N., Carta, M., Mulle, C., 2017. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 208–220.
- Rolls, E.T., Kesner, R.P., 2006. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog. Neurobiol.* 79, 1–48.
- Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., Hen, R., 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466–470.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Snyder, J.S., Choe, J.S., Clifford, M.A., Jeurling, S.I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, J.F., Cameron, H.A., 2009. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J. Neurosci.* 29, 14484–14495.
- Stark, S.M., Yassa, M.A., Stark, C.E., 2010. Individual differences in spatial pattern separation performance associated with healthy aging in humans. *Learn. Mem.* 17, 284–288.
- Stark, S.M., Yassa, M.A., Lacy, J.W., Stark, C.E., 2013. A task to assess behavioral pattern separation (BPS) in humans: data from healthy aging and mild cognitive impairment. *Neuropsychologia* 51, 2442–2449.
- Sultan, S., Gebara, E.G., Moullec, K., Toni, N., 2013. D-serine increases adult hippocampal neurogenesis. *Front. Neurosci.* 7, 155.
- Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., Gage, F.H., 2006. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442, 929–933.
- Toner, C.K., Pirogovsky, E., Kirwan, C.B., Gilbert, P.E., 2009. Visual object pattern separation deficits in nondemented older adults. *Learn. Mem.* 16, 338–342.
- Tronel, S., Belnoue, L., Grosjean, N., Revest, J.M., Piazza, P.V., Koehl, M., Abrous, D.N., 2012. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus* 22, 292–298.
- Veyrac, A., Gros, A., Bruel-Jungerman, E., Rochefort, C., Kleine Borgmann, F.B., Jessberger, S., Laroche, S., 2013. *Zif268/egr1* gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7062–7067.
- Wu, M.V., Luna, V.M., Hen, R., 2015. Running rescues a fear-based contextual discrimination deficit in aged mice. *Front. Syst. Neurosci.* 9, 114.
- Yassa, M.A., Mattfeld, A.T., Stark, S.M., Stark, C.E., 2011. Age-related memory deficits linked to circuit-specific disruptions in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8873–8878.
- Yassine, N., Lazaris, A., Dorner-Ciossek, C., Després, O., Meyer, L., Maitre, M., Mensah-Nyagan, A.G., Cassel, J.C., Mathis, C., 2013. Detecting spatial memory deficits beyond blindness in *tg2576* Alzheimer mice. *Neurobiol. Aging* 34, 716–730.

## Annexe 4 : Résultats de Master 2

Mes travaux de master ont permis de tester la faisabilité d'une approche de régénération des NCS à partir ces cellules souches neurales adultes (CSNa) de la zone sous-ventriculaire (ZSV). Ces CSNa donnent normalement naissance aux interneurons du bulbe olfactif et à des cellules gliales. Les analyses histologiques et moléculaires que j'ai conduites ont permis de mettre en évidence que la ZSV n'est pas altérée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, et qu'elle demeure fonctionnelle, et ceci, même à des stades avancés de la maladie. Ce pool de CSNa, à proximité du cortex cérébral où les NCS dégénèrent, permet d'envisager de les utiliser en tant que source cellulaire pour régénérer des MN. Durant ma première année de thèse, j'ai travaillé à la mise au point d'un protocole de différenciation dirigée des CSNa de la ZSV en NCS par surexpression du facteur de transcription *Fezf2*. J'ai pour ce faire choisi une approche d'injection stéréotaxique d'un plasmide encodant le gène *Fezf2* ainsi que le gène rapporteur *eGFP*, au sein du ventricule latéral, suivi d'une d'électroporation *in vivo*, afin de cibler les cellules de la ZSV qui bordent les ventricules latéraux. Cependant, mes résultats montrent que la majorité des cellules transfectées sont des cellules épendymales (différenciées) qui bordent les parois des ventricules latéraux et que ces cellules semblent être réfractaires à la différenciation. Après de nombreux essais, il apparaît que l'électroporation n'est pas la meilleure façon de cibler la ZSV adulte.

Faculté des Sciences de la Vie  
Master 2 Spécialité Neurosciences  
Parcours Neurosciences Cellulaires et Intégrées

2015

**Etude de la zone sous-ventriculaire dans un modèle murin  
de sclérose latérale amyotrophique  
en qualité de source potentielle de régénération neuronale**

**Thibaut BURG**

Rapport de stage M2S4  
Stage effectué sous la direction de **Caroline ROUAUX**  
INSERM U1118  
Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence

**Inserm**



Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

## **REMERCIEMENTS :**

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Philippe LOEFFLER pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir accordé sa confiance.

Je voudrais exprimer ma plus profonde reconnaissance à Caroline ROUAUX, ma responsable de stage, pour la confiance qu'elle a eu en moi, son encadrement technique, ses nombreux conseils et sa pédagogie, le tout dans une ambiance de travail agréable et sérieuse. J'ai pu acquérir une grande expérience scientifique et technique et participer à un projet de recherche des plus intéressants, qui m'a conforté dans mon envie de poursuivre en doctorat.

Je souhaite également remercier Christine MARQUES qui, au cours de ce stage, n'a pas compté le temps passé avec moi afin de me faire part de son expérience et de son savoir scientifique et technique. Ses nombreux conseils ont été d'une grande importance. De plus, sa gentillesse, sa bonne humeur et ses encouragements ont été très plaisants.

Je remercie également Luc DUPUIS pour la lecture critique de ce rapport et pour ses conseils, ainsi que l'ensemble des doctorants et techniciens pour les nombreux conseils et aides apportées tout le long de ce stage.

J'adresse toute ma sympathie à l'ensemble de l'équipe U1118 qui m'a rapidement intégré dans la vie du laboratoire. Leur accueil chaleureux et sympathique restera un très bon souvenir.

# SOMMAIRE

## RÉSUMÉ

## ABRÉVIATIONS

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
I. Sclérose Latérale Amyotrophique .....	1
II. Dégénérescence et régénération des neurones moteurs cortico-spinaux .....	2
III. Neurogenèse adulte et potentiel thérapeutique – vers une application dans la SLA .....	3
IV. Objectifs du stage de mater .....	4
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>5</b>
I. Animaux .....	5
II. Injections de BrdU .....	5
III. Techniques d’immunofluorescence .....	6
IV. Techniques moléculaires.....	8
V. Analyses statistiques .....	9
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>10</b>
I. Les populations cellulaires impliquées dans la neurogenèse adulte émanant de la ZSV sont préservées au cours de la pathologie chez les souris <i>Sod1<sup>G86R</sup></i> .....	10
II. A 90 jours, les modifications de la niche neurogénique que constitue la ZSV sont très discrètes.....	12
III. Les capacités prolifératives des CSN et PN de la ZSV sont préservées chez les souris <i>Sod1<sup>G86R</sup></i> .....	13
IV. Les capacités neurogéniques du système ZSV-FMR-BO sont préservées chez les souris <i>Sod1<sup>G86R</sup></i> .....	14
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>16</b>

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**BURG Thibaut**

**Master Neurosciences Cellulaires et Intégrées**

**Laboratoire d'accueil :** Unité INSERM 1118 : Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence.

**Responsable du stage :** ROUAUX Caroline

**Titre du rapport :** Etude de la zone sous-ventriculaire dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique, en qualité de source potentielle de régénération neuronale.

**Mots clés :** Sclérose Latérale Amyotrophique ; Neurones Moteurs Cortico-Spinaux ; Zone Sous-Ventriculaire ; Cellules Souches Neurales / Progéniteurs Neuronaux adultes ; stratégie thérapeutique.

**Résumé :** La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente du système moteur adulte. Elle conduit à une paralysie progressive puis à la mort des patients 3 à 5 ans après le diagnostic initial. Ces symptômes dramatiques résultent de la dégénérescence conjointe et sélective des neurones moteurs cortico-spinaux (NMCS) et des motoneurones spinaux (MNS). Malgré les nombreux essais cliniques envisagés pour bloquer la mort neuronale, il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la SLA. L'existence, au sein de la zone sous-ventriculaire (ZSV) du cerveau de mammifère adulte, de cellules souches neurales endogènes, représente une source potentielle de cellules permettant d'envisager la régénération de populations neuronales d'intérêt thérapeutique, et notamment des NMCS en conditions de SLA. L'objectif de mon travail de master était de tester la faisabilité d'une telle approche thérapeutique dans un modèle murin de SLA, les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Pour cela, j'ai évalué à différents stades de la maladie, l'état des populations cellulaires qui constituent la ZSV, ainsi que leurs capacités prolifératives et neurogéniques. Pour ce faire, j'ai combiné un traitement des animaux au BrdU à une analyse de différents marqueurs cellulaires par immunofluorescence, réalisé une analyse plus fine de l'expression de gènes-clés par qPCR. Les résultats de mes recherches montrent que les différentes populations cellulaires de la ZSV sont préservées, et que leurs capacités prolifératives et neurogéniques sont maintenues chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, et ce, même à des stades symptomatiques avancés. Dans leur ensemble, ces résultats permettent d'envisager l'utilisation des cellules souches neurales et progéniteurs neuronaux de la ZSV adulte à des fins thérapeutiques, par une approche de différenciation dirigée de ces populations en NMCS, afin, à terme, de tester l'effet de la régénération, *in situ* des NMCS dans un modèle murin de SLA.



## ABRÉVIATIONS

Ascl1 : Achaete-scute homolog 1	NeuN : Neuronal Nuclei
BO : Bulbe Olfactif	NMCS : Neurones Moteurs Cortico-Spinaux
BrdU : 5-bromo-2'-déoxyuridine	N.t. : Non traité
CA : Commissure Antérieure	Olig2 : Oligodendrocyte transcription factor 2
CC : Corps Calleux	PBS : Tampon Phosphate Salin
CD24 : Cluster de Différentiation 24	PN : Progéniteur Neuronal adulte
CE : Cellule Ependymale	Pol2 : Polymerase RNA 2 DNA directed
Crym : mu-crystalline	polypeptide A
CSN : Cellule Souche Neurale adulte	PSA-NCAM : Polysialylated-Neural Cell
Ctx : Cortex	Adhesion Molecul
DCX : Doublecortine	Sep : Septum
DFT : Dégénérescence Fronto-Temporale	SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
Dlx2 : Distal less homeobox 2	Sod1 : Superoxyde Dismutase 1
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor	Sox2 : SRY (sex determining region Y)-box 2
EGL : Eminence Ganglionnaire Latérale	Str : Striatum
Fezf2 : Fez family zinc finger 2	S100 $\beta$ : S100 alcium binding protein beta
FMR : Flux Migratoire Rostral	TBP : TATA-box Binding Protein
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein	Tha : Thalamus
GFP : Green Fluorescent Protein	UA : Unité Arbitraire
GLAST : Glutamate Aspartate Transporter	VL : Ventricule Latéral
Hyp : Hypothalamus	WT : Sauvage
MNS : Motoneurones Spinaux	ZSG : Zone Sous-Granulaire
NB : Neuroblaste	ZSV : Zone Sous-Ventriculaire
NCAM1 : Neural Cell Adhesion Molecule 1	

# INTRODUCTION

Les maladies neurodégénératives se caractérisent par la perte progressive de populations neuronales spécifiques, qui se traduit par le développement de symptômes neurologiques typiques de la détérioration des réseaux fonctionnels affectés. A l'aide de modèles moléculaires, cellulaires et animaux, les recherches précliniques se sont longtemps appliquées à caractériser les mécanismes moléculaires responsables de ces pertes neuronales sélectives, afin de développer des approches thérapeutiques visant à contrecarrer la mort neuronale et enrayer la progression de la neurodégénérescence. D'une manière générale, bien que cette première stratégie ait permis une meilleure compréhension des mécanismes neurodégénératifs, les bénéfices thérapeutiques sont peu nombreux.

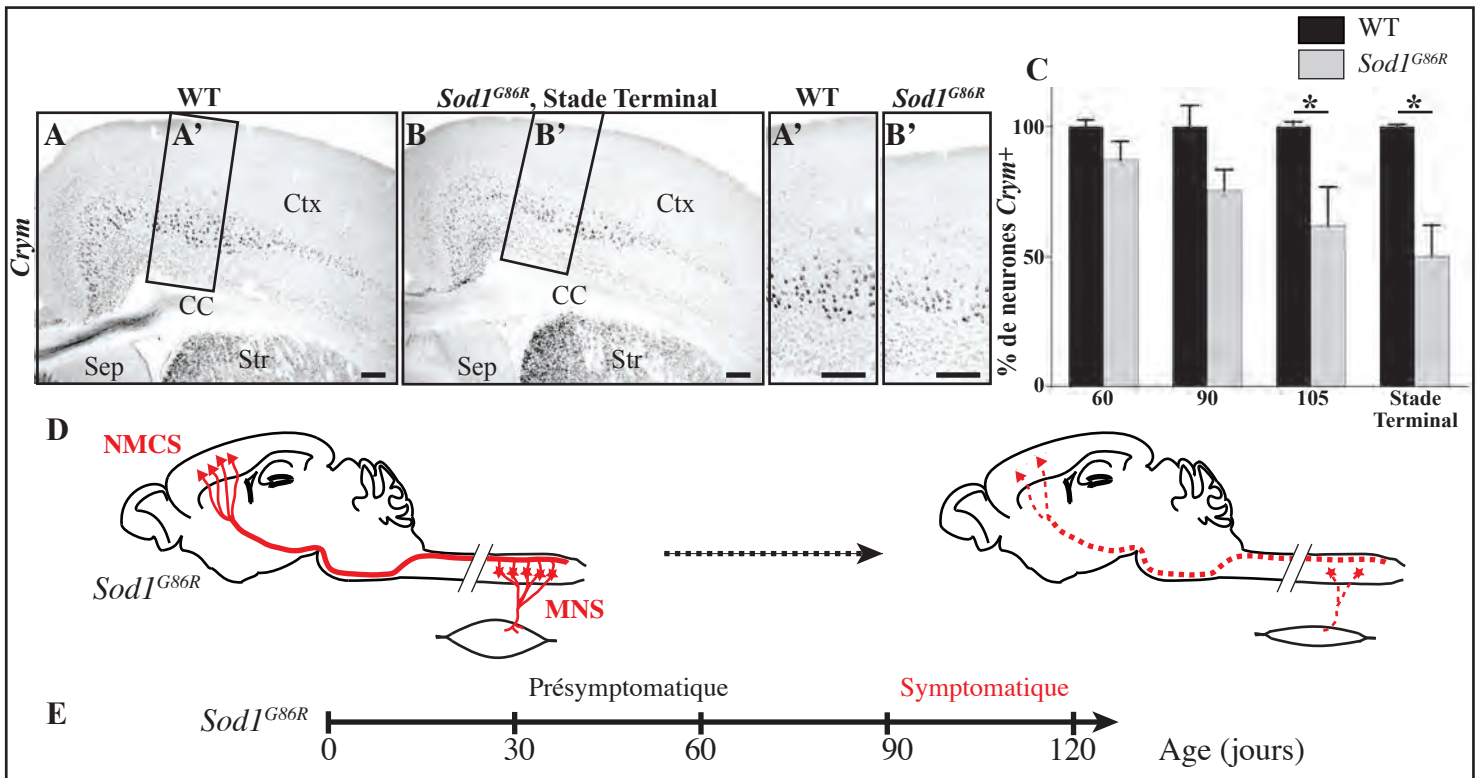
L'existence de cellules souches neurales (CSN), au sein du cerveau de mammifères adultes, offre une alternative prometteuse aux approches thérapeutiques actuelles. En effet, ces cellules multipotentes et capables de s'auto-renouveler permettent d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques, basées sur le remplacement, au sein même du cerveau lésé, de populations neuronales sélectivement endommagées, sans greffe de cellules hétérologues. La faisabilité de telles approches repose sur deux conditions essentielles : *i*) un maintien des CSN et de leurs fonctions en dépit des conditions neurodégénératives ; et *ii*) la capacité de modifier les CSN afin de leur permettre de générer des populations neuronales d'intérêt thérapeutique.

Au cours de mon stage de Master, j'ai entrepris de tester la faisabilité d'une telle approche régénérative dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique (SLA).

## **I. Sclérose Latérale Amyotrophique**

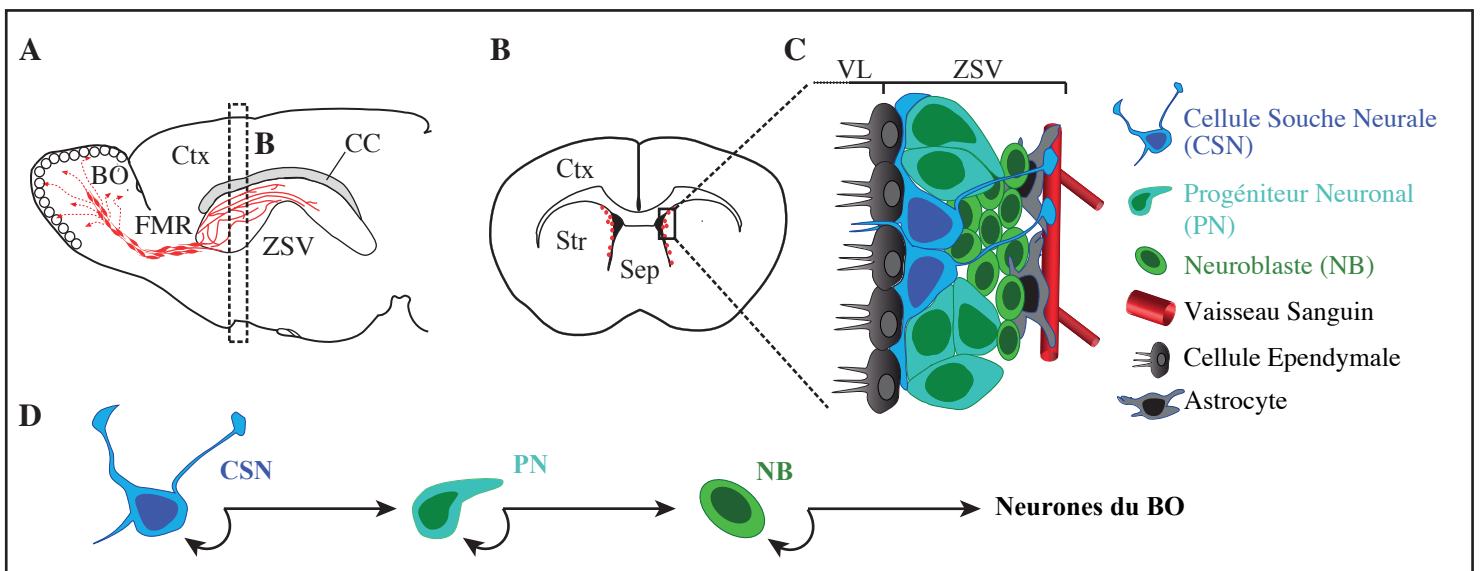
Avec une incidence de 2/100 000, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la plus fréquente des maladies neurodégénératives du système moteur adulte. Elle se déclare aux alentours de 50-70 ans, se traduit par une paralysie progressive, et conduit au décès des patients en 3 à 5 ans seulement, pour cause d'insuffisance respiratoire (Kiernan et al., 2011). Ces symptômes typiques découlent de la dégénérescence sélective et conjointe de deux populations neuronales distinctes : les neurones moteurs cortico-spinaux (NMCS), situés dans le cortex cérébral et projetant vers la moelle épinière, et les motoneurones spinaux (MNS), situés dans le tronc cérébral et la corne ventrale de la moelle épinière et projetant vers les muscles striés squelettiques.

Si la SLA se présente majoritairement sous des formes sporadiques, il existe également des formes familiales, qui représentent environ 10% des cas (Renton et al., 2013). Le gène



**Figure 1 : Les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* reproduisent une dégénérescence sélective et combinée des NMCS et des MNS caractéristique de la sclérose latérale amyotrophique (SLA).**

**A-B')** Images représentatives de l'expression de la *mu-crystalline* (*Crym*) révélée par hybridation *in situ* sur des coupes coronales de cerveaux de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (**B,B'**) et leurs contrôles sauvages (**A,A'**) du même âge (115 jours en moyenne) (Marques et Rouaux, résultats non publiés). **C)** La quantification des neurones positifs pour *Crym* et situés dans la couche V du cortex moteur révèle une perte progressive de cette population neuronale chez souris *Sod1<sup>G86R</sup>* comparées aux contrôles (Marques et Rouaux, résultats non publiés). **D)** Représentation schématique de la dégénérescence progressive, sélective et combinée des Neurones Moteurs Corticospinaux (NMCS) et des Motoneurons Spinaux (MNS) chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, ainsi que du tractus corticospinal et des nerfs moteurs. **E)** Schéma du déroulement de la maladie chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Les premiers symptômes moteurs apparaissent aux alentours de 90 jours, puis une paralysie progressive s'installe rapidement, jusqu'au décès des animaux aux alentours de 115 jours. Ctx: cortex cérébral; CC: corps calleux; Sep: septum; Str: striatum; WT: sauvage; Echelle : 150µm (A-B').



**Figure 2 : Neurogénèse adulte dans le système ZSV-FMR-BO de souris.**

**A)** Représentation schématique du système ZSV-FMR-BO, du cerveau de souris adulte en vue latérale. Les neuroblastes, générés au niveau de la zone sous-ventriculaire (ZSV) migrent, au sein du flux migratoire rostral (FMR) vers les bulbes olfactifs (BO). Au niveau des BO, les neuroblastes migrent de manière radiale et terminent de se différencier. **B)** Représentation schématique de la ZSV sur une coupe coronale de cerveau de souris adulte. La ZSV borde les parties latérale et dorsale du ventricule latéral (VL), isolant le striatum du ventricule latéral. **C)** Cytoarchitecture de la ZSV. Le système ZSV-FMR-BO de souris se compose de différents types cellulaires : les cellules souches neurales (CSN), les progéniteurs neuronaux (PN), et les neuroblastes (NB). **D)** Schéma représentant le mode de génération des neurones du BO. Ctx: cortex cérébral; CC: corps calleux; Sep: septum; Str: striatum.

encodant la superoxyde dismutase 1 à cuivre et zinc, *Sod1*, fut le premier découvert, aux début des années 1990. On estime à l'heure actuelle que les mutations de *Sod1* correspondent à 12% des cas familiaux (Renton et al., 2013). La découverte d'un premier gène lié à la SLA a permis le développement de tout premiers modèles murins de la maladie, qui ont largement contribué à mettre en évidence nombre de mécanismes impliqués dans la mort neuronale, et plus particulièrement dans la dégénérescence des MNS (Shaw, 2005). Bien que d'autres gènes responsables de cas familiaux de SLA aient été identifiés très récemment (Renton et al., 2013), les rongeurs surexprimant une forme mutée du gène *Sod1* demeurent, à l'heure actuelle, les seuls modèles validés de SLA (Turner and Talbot, 2008). L'unité INSERM 1118, au sein de laquelle j'ai effectué mon stage de Master, étudie en particulier la lignée de souris *mSod1<sup>G86R</sup>* (notée simplement *Sod1<sup>G86R</sup>* dans ce rapport), qui surexpriment une forme mutée et inactive du gène murin, équivalente à la mutation G85R identifiée chez certains patients SLA (Ripps et al., 1995).

## II. Dégénérescence et régénération des neurones moteurs cortico-spinaux

En dépit de la définition clinique précise de la SLA, une dégénérescence conjointe et spécifique des neurones moteurs cortico-spinaux (NMCS) et des motoneurones spinaux (MNS), il est frappant de noter que les NMCS, et plus largement le cortex cérébral, ont été très largement oubliés des recherches précliniques, qui se sont davantage concentrées sur les MNS et la moelle épinière. Cependant, de récentes données de la génétique lient à présent clairement la SLA à une autre maladie neurodégénérative, purement corticale, la démence fronto-temporale (DFT). En effet, il est à présent établi que 15% des cas de SLA évoluent vers une DTF, et vice-versa (Ling et al., 2013). Ces données récentes contribuent à replacer le cortex cérébral, et les NMCS, au cœur de la recherche sur la SLA.

De récents travaux effectués au laboratoire ont permis de mettre en évidence une dégénérescence progressive des NMCS chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (Marques et Rouaux, résultats non publiés) (Figure 1A-C). Vingt ans après la génération des souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, et la description de la dégénérescence progressive de leurs MNS (Ripps et al., 1995), ces données terminent donc de valider cette lignée en tant que modèle de SLA (Figure 1D). Ces animaux développent en effet les symptômes moteurs typiques de la SLA, avec une paralysie progressive qui débute aux alentours de 90 jours, et évolue très rapidement vers une paralysie totale et la mort des animaux, aux alentours de 120 jours (Figure 1E).

L'absence de traitement curatif de la SLA, et les échecs répétés des essais cliniques envisagés pour bloquer la mort neuronale (et en particulier la mort des MNS), suggère qu'il est

nécessaire de repenser les postulats de départ et de tester de nouvelles approches thérapeutiques. L'une de ces alternatives réside dans le remplacement des populations neuronales décimées par la maladie, et plus particulièrement le remplacement des MNCS au sein du cerveau malade. De fait, la génération de NMCS à partir de divers types neuraux, *in vivo*, a déjà des précédents. Il est en effet possible, par simple surexpression du facteur de transcription Fezf2 (Fez family zinc finger 2), de générer des populations ectopiques de NMCS à partir de progéniteurs du striatum (programmation) chez l'embryon de souris (Rouaux and Arlotta, 2010), ou encore de neurones calleux post-mitotiques (reprogrammation) chez le souriceau (Rouaux and Arlotta, 2013). L'application de ces approches de recherche fondamentale à un contexte neurodégénératif, tels que celui de la SLA, chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* par exemple, permettrait de tester, pour la première fois, la régénération d'une population neuronale d'intérêt thérapeutique, au sein même du cerveau malade. Se pose alors la question des cellules à cibler pour induire, dans le cerveau adulte, la génération de nouveaux NMCS. Les cellules souches neurales (CSN) apparaissent comme des candidats évidents : de par leur pluripotente, elles représentent certainement les cellules les moins différenciées, et par conséquent, les plus « plastiques » et les plus « faciles à reprogrammer » du cerveau adulte. En outre, plusieurs études ont d'ores et déjà mis en évidence la capacité des CSN à adapter l'identité des cellules auxquelles elles donnent naissance en réponse à la manipulation de facteurs intrinsèques ou extrinsèques, dans le cerveau de souris adultes (Jackson et al., 2006; Jessberger et al., 2008).

### **III. Neurogenèse adulte et potentiel thérapeutique – vers une application dans la SLA**

La neurogenèse adulte est le processus permettant la génération de neurones fonctionnels à partir de cellules souches neurales (CSN), au sein du cerveau adulte adultes. Dans le cerveau des mammifères, ce phénomène est limité dans l'espace à deux niches neurogéniques, la zone sous-ventriculaire (ZSV) (Figure 2A) et la zone sous granulaire (ZSG) de l'hippocampe (Ming and Song, 2011), et dans le temps, puisqu'il existe une corrélation entre l'âge et le déclin du processus neurogénique (Hamilton et al., 2013). Parmi ces deux niches neurogéniques, la ZSV possède un potentiel thérapeutique plus important que la ZSG : chaque jour, la ZSV produit plus de neurones que la ZSG (30 000 contre 9 000 chez le rat adulte ; Chen et al., 2014), et les cellules générées par la ZSV possèdent, en conditions physiologiques, une plus grande capacité migratoire que les cellules issues de la ZSG.

Les cellules souches neurales CSN (cellules gliales radiales ou cellules de type B) de la ZSV se situent sous une couche de cellules épendymales (cellules de type E) au niveau des

parois des ventricules latéraux (Figure 2B,C,D). Les CSN prolifèrent lentement et donnent naissance à des Progéniteurs Neuronaux (PN, cellules amplifiantes transitoires ou cellules de type C), ayant une capacité de prolifération plus importante, et qui génèrent des Neuroblastes (NB, cellules de type A) (Figure 2C,D). Ces derniers migrent le long du flux migratoire rostral (FMR) pour atteindre le bulbe olfactif (BO) où ils se différencient en interneurons (Ming et Song, 2011) (Figure 2A).

La neurogénèse de la ZSV est contrôlée par grand nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques (Zhao et al., 2008) et par la qualité du microenvironnement de la niche neurogénique : un riche réseau vasculaire (Tavazoie et al., 2008) et une matrice extracellulaire particulière (Shen et al., 2008), tous deux impliqués dans l'apport de facteurs de croissance. En conséquence, le processus de neurogénèse adulte est particulièrement sensible aux changements du microenvironnement cellulaire, et notamment à la neurodégénérescence. En effet, la majorité des études réalisées chez les patients de maladie d'Alzheimer et de Parkinson, et dans les modèles animaux correspondants, concluent en une diminution globale de la neurogénèse adulte, due à une diminution de la prolifération et/ou de la survie des neurones générés. Au contraire, chez les patients de maladie de Huntington, les études montrent une augmentation de la prolifération au sein de la ZSV et une augmentation du nombre de neuroblastes générés, qui s'accompagne en outre, dans les modèles animaux, d'une migration de ces derniers vers le striatum, au détriment du BO (Winner et al., 2011).

#### **IV. Objectifs du stage de mater**

L'objectif de mon stage de master a été de tester la faisabilité d'une approche régénérative des NMCS en conditions de SLA. Pour ce faire, j'ai évalué l'état des différentes populations cellulaires qui constituent le système ZSV-FMR-BO, ainsi que les capacités prolifératives et neurogéniques des CSN/PN de la ZSV, chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* en comparaison aux souris sauvages, à différents stades pré-symptomatiques et symptomatiques de la maladie. Les résultats de mon travail de recherche permettent d'ores et déjà de conclure que la neurogénèse émanant de ZSV adulte n'est que très peu affectée par la progression de la pathologie chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, que la population de CSN est préservée, et que ses fonctions sont maintenues. Il apparaît donc envisageable de cibler ces CSN pour tester l'effet de la régénération des NMC, dans un modèle murin de SLA.

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## I. Animaux

Toutes les procédures expérimentales utilisées ont été autorisées par le Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animal de Strasbourg (CREMAS n°35) sous les notifications d’autorisation de projet n° 00738.01, et 00767.01.

Les expériences ont été menées sur les souris transgéniques de la lignée FVB/N *Sod1<sup>G86R</sup>* (Ripps et al., 1995) et leurs contrôles sauvages, issus de mêmes portées. Ces souris surexpriment une forme inactive et mutée (substitution de l’arginine par la glycine au niveau du résidu 86) du gène murin *superoxyde dismutase 1*. Les souris ont été élevées à l’animalerie centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg, à une température constante de 22°C, avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l’eau ont été fournies *ab libitum*. Pour limiter le nombre de portées générées, les femelles ont été utilisées pour les expériences d’immunohistochimie sur coupes coronales, les mâles pour les expériences de qPCR et d’immunohistochimie sur coupes sagittales.

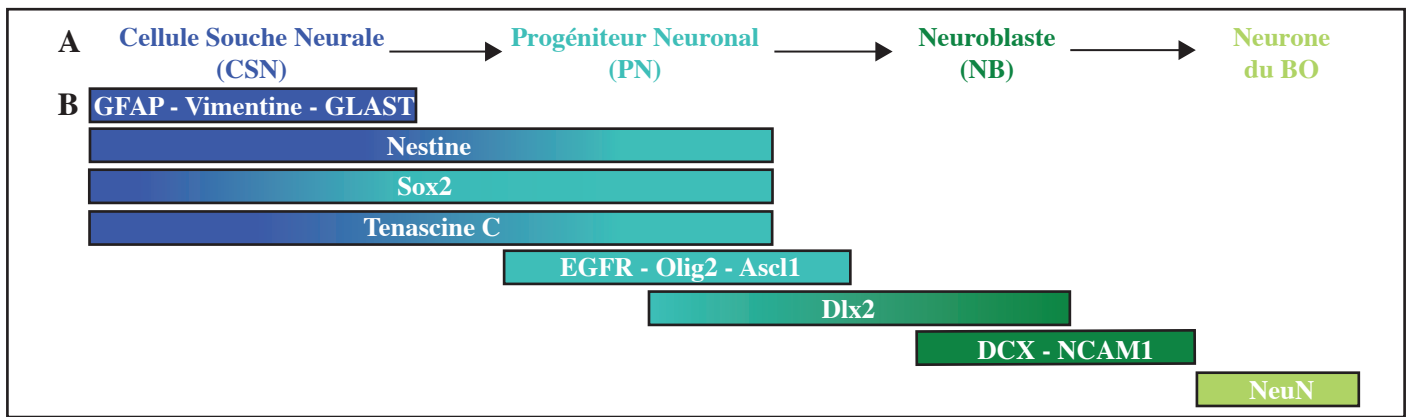
## II. Injections de BrdU

Le BrdU, un nucléotide de synthèse analogue de la thymidine, a la propriété de s’insérer dans l’ADN des cellules en réplication, lors de la phase de synthèse de l’ADN (S). Il demeure ensuite dans l’ADN cellulaire, à son niveau maximal d’incorporation si l’animal est sacrifié peu de temps après avoir été injecté, ou encore si la cellule qui l’a incorporé quitte le cycle cellulaire et cesse de se diviser.

Pour étudier la prolifération cellulaire, 8 groupes d’animaux, sauvages et transgéniques, âgés de 30, 60, 90 et 105 jours (n=4 WT et n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>* par âge), ont reçu une dose unique de 50mg/kg de BrdU (Sigma, B9285-16), dilué dans du NaCl 0,9%, par voie intrapéritonéale, deux heures avant le sacrifice (Doetsch et al., 1999; Liu and Martin, 2006).

Pour étudier la neurogénèse issue de la ZSV, 8 groupes d’animaux, sauvages et transgéniques, ont été injectés quotidiennement au BrdU par voie intrapéritonéale, à une dose de 180mg/kg/jour, entre 15 et 30 jours (n=2 WT et n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 45 et 60 jours (n=4 WT et n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 75 et 90 jours (n=5 WT et n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) et entre 90 et 105 jours (n=5 WT et n=5 *Sod1<sup>G86R</sup>*), et sacrifiés le lendemain de la dernière injection, comme précédemment décrit (Chen et al., 2004).





**Figure 3 : Les cellules impliquées dans la neurogénèse adulte émanant de la zone sous-ventriculaire (ZSV) expriment des combinaisons uniques de marqueurs.** A) Schéma des types cellulaires impliqués dans la neurogénèse de la ZSV adulte. B) Marqueurs exprimés par les différents sous-types cellulaires impliqués dans la neurogénèse des neurones du bulbe olfactif (BO). Ascl1: achaete-scute homolog 1; DCX: doublecortine; Dlx2: distal less homeobox-2; EGFR: epidermal growth factor receptor; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLAST: glutamate-aspartate transporter; NCAM1: neural cell adhesion molecule 1; NeuN: neuronal nuclei; Olig2: oligodendrocyte transcription factor 2; Sox2: SRY (Sex determining region Y)-box 2.

Antigène	Type cellulaire marqué	Fournisseur	Référence	Espèce productrice	Dilution
BrdU	Cellule en réplcation	BD Transduction	347580	Souris	1/500
GFAP	CSN	Dako	20334	Lapin	1/500
Nestine	CSN et PN	Millipore	MAB353	Souris	1/1000
Sox2	PN	Millipore	AB5603	Lapin	1/500
DCX	Neuroblaste	Millipore	AB2253	Cochon d'Inde	1/1000
NeuN	Neurone post-mitotique	Millipore	ABN78	Lapin	1/500
Souris - Alexa488		Life Technologies	A11001	Chèvre	1/500
Lapin - Alexa488		Molecular Probes	A11034	Chèvre	1/500
Lapin - Alexa547		Life Technologies	A11035	Chèvre	1/500
Cochon d'Inde - Alexa547		Molecular Probes	A11074	Chèvre	1/500

**Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés dans le cadre de l'étude du système ZSV-FMR-BO de souris adulte.** Les couleurs indiquent les différents sous-types cellulaires reconnus, en conformité avec la Figure 3. BrdU: 5-bromo 2'-déoxyuridine. Les noms des gènes et des types cellulaires sont définis dans la liste des abréviations ainsi que dans la légende de la Figure 3.

ARNm	Cellules	n° de dépôt	oligonucléotide sens	oligonucléotide anti-sens
<i>S100β</i>	CE	NM_009115	CTGGAGAAGGCCATGGTTGC	CTCCAGGAAGTGAGAGAGCT
<i>Cd24</i>	CE	NM_009846	CCACGCAGATTACTGCAACC	AGCGTTACTTGGATTGGGGA
<i>Gfap</i>	CSN	NM_001131020	TCGAGATCGCCACCTACAG	GTCTGTACAGGAATGGTGATGC
<i>Glast</i>	CSN	NM_148938	CAGAGTCAGAAAAGTTGTCTCTC	TCCTTGCGTGTCACTGTCTT
<i>Vimentine</i>	CSN	NM_011701	TCCAGAGAGAGGAAGCCGAA	AAGGTCAAGACGTGCCAGAG
<i>Nestine</i>	CSN et PN	NM_016701	AGAGGGGTCTGAGTCTGCTT	CCACGCTAGTCACCTCTTGG
<i>Tenascine C</i>	CSN et PN	NM_011607	TGGAGTACGAGCTGCATGAC	AAACTTGGTGGCGATGGTAG
<i>Sox2</i>	CSN et PN	NM_011443	AGAACCCCAAGATGCACAAC	CTCCGGGAAGCGTGACTTA
<i>Egfr</i>	PN	NM_207655	AGGCACAAGTAACAGGCTCAC	AAGGTCGTAATTCCTTTGCAC
<i>Olig2</i>	PN	NM_016967	CTGGCGCGAAACTACATCCT	CGTAGATCTCGCTCACCAGTC
<i>Ascl1</i>	PN	NM_008553	TCTCCTGGGAATGGACTTTG	GGTTGGCTGTCTGGTTTGT
<i>Dlx2</i>	PN et NB	NM_010054	CAGTTCGTCTCCGGTCAACA	GGAGTAGATGGTGGTGGTT
<i>Ncam1</i>	NB	NM_001081445	AGAGGACGGGAAGTCCATCA	GAGCGCTCTGTACTTGACCA
<i>Dcx</i>	NB	NM_001110222	GAGTGCCTACATTTATACCATTG	TGACATTCTTGGTGTACTCAACCT
<i>Sod1</i>	Ubiquitaire	NM_011434	GAGACCTGGGCAATGTGACT	GTTTACTGCGCAATCCCAAT
<i>Pol2</i>	Ubiquitaire	NM_153798	GCTGGGAGACATAGCACCA	TTACTCCCCTGCATGGTCTC
<i>Tbp</i>	Ubiquitaire	NM_013684	CCAATGACTCCTATGACCCCTA	CAGCCAAGATTCACGGTAGAT

**Tableau 2 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées en qPCR pour analyser l'expression de gènes d'intérêt dans la zone sous-ventriculaire.** Les couleurs indiquent les différents sous-types cellulaires reconnus, en conformité avec la Figure 3. CE: cellule épendymale; *Pol2*: Polymerase RNA 2 DNA directed polypeptide A; *Sod1*: Superoxyde dismutase 1; *Tbp*: TATA-box binding protein. Les noms des gènes et des cellules sont définis dans la liste des abréviations ainsi que dans la légende de la Figure 3.

### **III. Techniques d'immunofluorescence**

#### **1. Prélèvement des tissus pour l'immunofluorescence**

Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital de sodium (120mg/kg). Après endormissement, ils ont été perfusés en intracardiaque, avec une solution de PBS (tampon phosphate salin) 0,1M, puis une solution de paraformaldéhyde à 4% dans du PBS 0,1M. Les cerveaux ont été rapidement prélevés, post-fixés 24h dans du paraformaldéhyde à 4% et lavés trois fois au PBS 0,1M. Les cerveaux ont ensuite été inclus dans de l'agar à 4%, avant d'être coupés selon les plans coronal ou sagittal, à 40 $\mu$ m d'épaisseur, à l'aide d'un vibratome Leica VT 1000 S, selon les recommandations du fournisseur (Leica Biosystems, Nussloch, Allemagne). Les coupes de cerveaux ont été collectées dans des boîtes de 24 puits (coupes coronales) ou de 12 puits (coupes sagittales), et conservées dans du PBS 0,1M complété à 0,025% d'azide de sodium.

#### **2. Immunofluorescence**

Tous les anticorps, primaires et secondaires, utilisés au cours de cette étude, les protéines reconnues, les fournisseurs, références et dilutions utilisées sont listés dans le Tableau 1. Chaque anticorps secondaire a été testé individuellement (contrôles « sans primaire ») pour vérifier la spécificité des marquages obtenus avec les anticorps primaires suivis des anticorps secondaires.

Les coupes flottantes sélectionnées pour les différents marquages ont été placées dans des puits à fond grillagé, adapté aux boîtes de 12 puits. Toute la procédure a été réalisée sous agitation et à température ambiante, sauf l'incubation avec la solution d'anticorps primaire, réalisée à 4°C. Après 4 lavages de 5min au PBS 0,1M, les coupes flottantes ont été incubées 1h, dans un volume de 3ml de tampon de blocage composé de 8% de sérum de chèvre, 0,3% d'albumine de sérum bovin, 0,3% de triton X-100 dans du PBS 0,1M à 0,025% d'azide de sodium. Les coupes ont ensuite été incubées une nuit, dans un volume de 1,5ml d'anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage, puis lavées 3 fois 10min au PBS 0,1M, avant d'être incubées 2h dans un volume de 1,5ml d'anticorps secondaire dilué dans le tampon de blocage, puis 10min avec le marqueur d'ADN Hoechst (Sigma, B2261), dilué à 1 $\mu$ g/ml final dans du PBS 0,1M. Après trois lavages de 10min au PBS 0,1M, les coupes ont été montées sur lames, dans un bain d'eau distillée, puis laissées à sécher 30 à 45 min à l'abri de la lumière. Finalement, 100 $\mu$ l de milieu de montage DPX (Sigma, 6522) a été déposé le long des lames, avant de positionner les lamelles. Après 24h de séchage, les lames ont été photographiées, ou stockées à l'abri de la lumière, à 4°C, jusqu'à acquisition des images.

Pour révéler le BrdU, cette procédure a été modifiée de la manière suivante, afin de dénaturer l'ADN cellulaire et démasquer l'épitope : avant l'étape de blocage, les coupes flottantes ont été successivement incubées 10s dans de l'eau distillée puis 2h dans une solution d'HCl à 2M, avant d'être lavées 4 fois 5min dans du PBS 0,1M. Outre le « contrôle sans primaire », précédemment décrit, la spécificité du marquage BrdU a été vérifiée sur des tissus provenant d'un animal non injecté.

### **3. Marquage des différentes populations cellulaires du système ZSV-FMR-BO**

Afin d'estimer l'état des populations cellulaires qui composent le système zone sous-ventriculaire (ZSV) – flux migratoire rostral (FMR) – bulbe olfactif (BO) du cerveau de souris adulte, les cellules souches neurales (CSN), progéniteurs neuronaux (PN), neuroblastes (NB) et neurones du BO (Figure 3) ont été révélés par l'emploi de combinaisons d'anticorps listés dans le Tableau 1, et révélés par immunofluorescence. Pour la ZSV et le BO, 4 animaux sauvages et 4 animaux transgéniques ont été analysés à chaque âge d'intérêt (30, 60, 90, 105 jours ; n=4 WT et n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>* par âge). Pour le FMR, 3 animaux sauvages et 4 animaux transgéniques (n=3 WT et n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) ont été analysés à l'âge unique de 90 jours.

*ZSV* : trois coupes coronales par animal ont été sélectionnées, le long de l'axe rostro-caudal : la première, rostrale, avec comme point de repère la fusion du corps calleux (Bregma  $\approx$  0,14mm), la troisième, caudale, avec comme point de repère la fusion de la commissure antérieure (Bregma  $\approx$  1,10mm), et la deuxième, intermédiaire, à égale distance des coupes rostrale et caudale (Bregma  $\approx$  0,62mm). Les coupes ont ensuite été regroupées par génotype et par âge pour l'immunofluorescence.

*BO* : en prenant comme point de repère l'apparition du noyau olfactif antérieur (Bregma entre  $\approx$  4mm et 5,5mm), les trois coupes de BO situées dans le même puits de collection de la boîte 24 puis ont été sélectionnées par animal. Les coupes ont ensuite été regroupées par génotype et par âge pour l'immunofluorescence.

*FMR* : pour chaque cerveau, le FMR a été recherché à l'aide d'un stéréomicroscope, et deux coupes adjacentes présentant le FMR ont été sélectionnées pour l'analyse (Latéral  $\approx$  0,72mm). Les coupes ont ensuite été regroupées par génotype pour l'immunofluorescence.

### **4. Acquisition et quantification des images de microscopie**

Les images d'immunofluorescence ont été obtenues à l'aide d'un microscope droit à fluorescence (Nikon Eclipse E800), équipé d'une caméra DS-Ri1 (Nikon), et piloté par le logiciel NIS Element (Nikon). Les images confocales ont été obtenues à l'aide d'un

microscope confocal LMS 710 (Zeiss), piloté par le logiciel Zen (Zeiss). Les images ont ensuite été regroupées, par région anatomique, type de marquage et âge, pour permettre la comparaison entre les génotypes et la mise en évidence de différences potentielles entre animaux sauvages et transgéniques.

Les quantifications des cellules BrdU+ (ZSV et BO) et BrdU+/NeuN+ (BO) ont été réalisées sur des images acquises au microscope à fluorescence avec un objectif 10x.

#### **IV. Techniques moléculaires**

##### **1. Prélèvement des tissus pour la biologie moléculaire**

Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital de sodium (120mg/kg), et, après endormissement, les têtes ont été rincées à l'éthanol 70%. Les animaux ont ensuite été décapités et les cerveaux rapidement sortis des boîtes crâniennes avant d'être placés dans une matrice immergée dans du PBS 0,1M stérile et froid, afin de réaliser des coupes coronales de 1mm d'épaisseur. Deux coupes contenant la ZSV (Bregma  $\approx$  1,18mm et 0,5mm) ont été transférées dans une boîte de Pétri, et la ZSV a été microdisséquée sous un stéréomicroscope. Les ZSV collectées ont ensuite été immédiatement congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

##### **2. Extraction et dosage des ARN**

Après ajout de 250 $\mu$ L de Trizol (Ambion, 15596), les ZSV ont été broyées à l'aide d'un pilon. Les extraits ont ensuite été centrifugés 15min à 12 000g, 4°C. 50 $\mu$ l de chloroforme froid a été ajouté au surnageant et le mélange a été vortexé 15s avant d'être centrifugé 10min à 12 000g, 4°C. La phase aqueuse, contenant les ARN a été séparée de la phase organique, contenant lipides et protéines. Les ARN ont ensuite été concentrés par ajout, volume à volume, d'isopropanol, homogénéisation et centrifugation 10min à 12 000g, 4°C. Après lavage à l'éthanol 75%, le culot a été re-centrifugé 10min à 12 000g, 4°C. Le surnageant a été retiré et le culot laissé à sécher, avant d'être re-suspendu dans 20 $\mu$ l d'eau ultra pure. La concentration des échantillons a été mesurée par spectrophotométrie au Nanodrop (ThermoScientific). Les ARN ont été considérés purs lorsque le ratio A260/A280 était compris entre 1,8 et 2,1 et lorsque le ratio A260/A230 était proche de 2.

##### **3. Rétrotranscription des ARN en ADNc**

290ng d'ARN de chaque échantillon a été retro-transcrit pour obtenir l'ADN complémentaire (ADNc) correspondant, grâce au mélange commercial iScript Reverse

Transcription Supermix for RT-qPCR (Biorad), contenant enzyme, dNTP, random primers et tampon, dans un thermocycleur C1000 (BioRad), par incubation 5min à 25°C, 30min à 42°C, et 5min à 85°C.

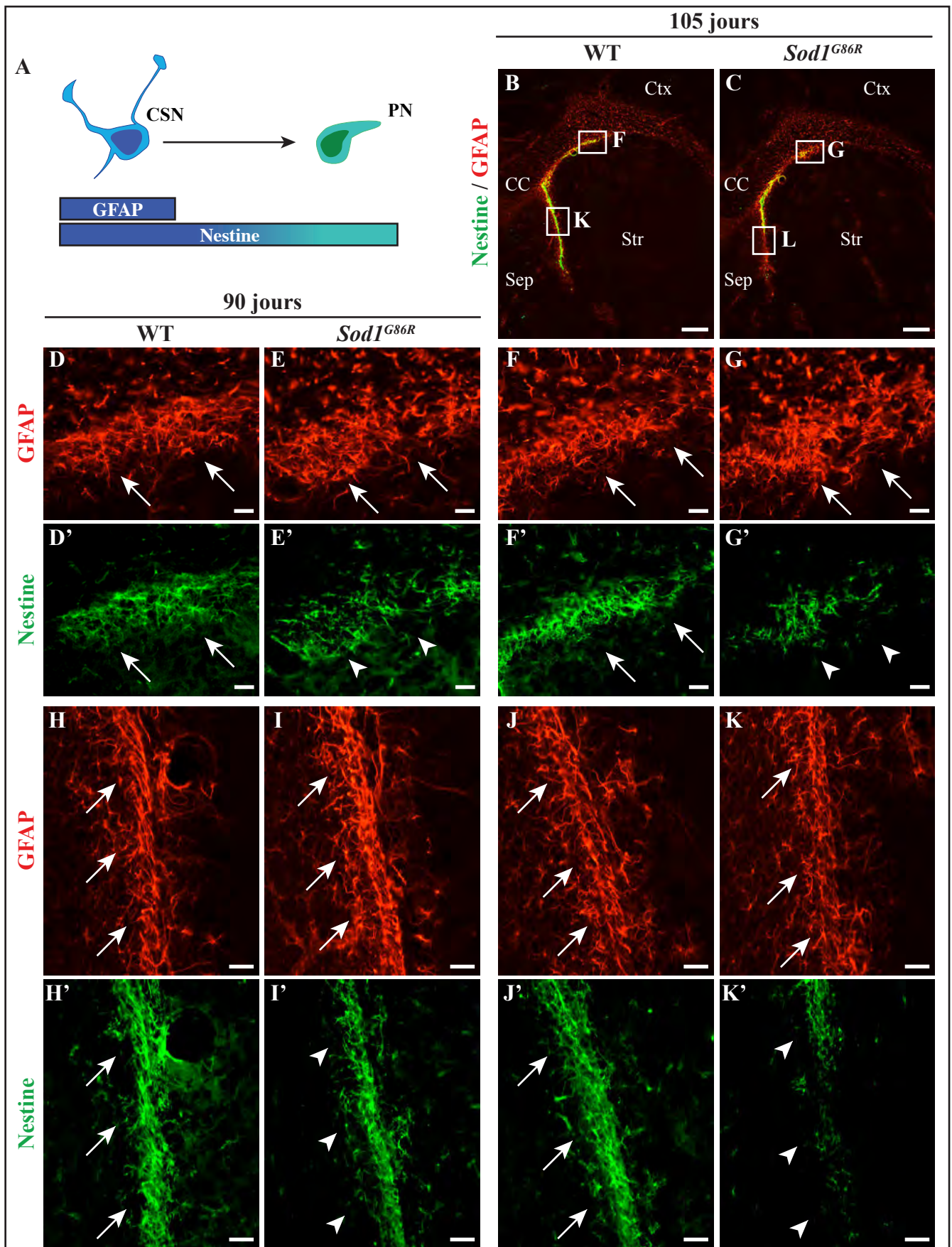
#### **4. qPCR**

Tous les couples d'amorces nucléotidiques, utilisés au cours de cette étude, les ARN messagers reconnus, et leur numéro de dépôt sont listés dans le Tableau 2.

L'expression des différents gènes d'intérêts (Tableau 2) a été mesuré par PCR en temps réel (qPCR). Les réactions de PCR ont été réalisées sur une dilution d'ADNc (1/20), amplifiée par le mélange commercial SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad), dans un thermocycleur CFX96 (Biorad) avec 40 cycles dénaturation (30sec, 95°C) / hybridation (5sec, 95°C) / élongation (30sec, 60°C). Les niveaux d'expression des gènes cibles ont été normalisés à l'aide de deux gènes d'expression constitutive, TBP et Pol2 (Tableau 2), via le programme GeNorm Software 3,5 (Vandesompele et al., 2002).

#### **V. Analyses statistiques**

Toutes les valeurs sont représentées sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM (erreur standard à la moyenne). Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 6 (GraphPad). L'analyse de variance à deux facteurs (2way ANOVA) a été utilisée pour analyser les comptages de cellules positives pour le BrdU, le test paramétrique de Student (T-test) pour les résultats de qPCR, et de colocalisation BrdU/NeuN. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figure 4 : L'analyse des marqueurs de cellules souches neurales montrent une perte spécifique de la Nestine chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* symptomatiques.**

**A)** Schéma de l'expression des marqueurs GFAP et Nestine par les cellules souches neurales (CSN) et progéniteurs neuro-naux (PN) de la zone sous-ventriculaire (ZSV). **B-C)** Images représentatives de coupes coronales de cerveaux de souris sauvages (WT) et transgéniques (*Sod1<sup>G86R</sup>*) à l'âge symptomatique de 105 jours, au niveau de la ZSV, après révélation de la GFAP (rouge) et de la Nestine (vert) par immunofluorescence. **D-K')** Agrandissements des parties dorsales (D-G') et ventrales (H-K') de la ZSV, chez les souris WT et *Sod1<sup>G86R</sup>* à 90 et 105 jours. Notez le maintien (flèches pleines) des niveaux de GFAP (rouge) et au contraire la baisse (pointes de flèche) des niveaux de Nestine (vert), chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* en comparaison aux WT. CC: corps calleux; Ctx: cortex; Sep: septum; Str: striatum; GFAP: glial fibrillary acidic protein. Echelle : 200 $\mu$ m (B-C) et 20 $\mu$ m (D-K').

## RÉSULTATS

Les cellules souches neurales (CSN) et progéniteurs neuronaux (PN) qui persistent dans le cerveau de mammifère adulte au sein de la zone sous-ventriculaire (ZSV) représentent une source potentielle de neurones d'intérêts thérapeutiques. Dans une perspective d'exploiter ce potentiel neurogénique à des fins régénératives, j'ai étudié, au cours de mon stage de Master, l'état de la ZSV de souris modélisant la sclérose latérale amyotrophique (SLA), les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Plus spécifiquement j'ai évalué l'état des différentes populations cellulaires de la ZSV, leurs capacités prolifératives et neurogéniques, afin de déterminer si les CSN/PN de la ZSV pourraient servir de point de départ à la régénération des neurones moteurs cortico-spinaux (NMCS) qui dégénèrent sélectivement au cours de la SLA.

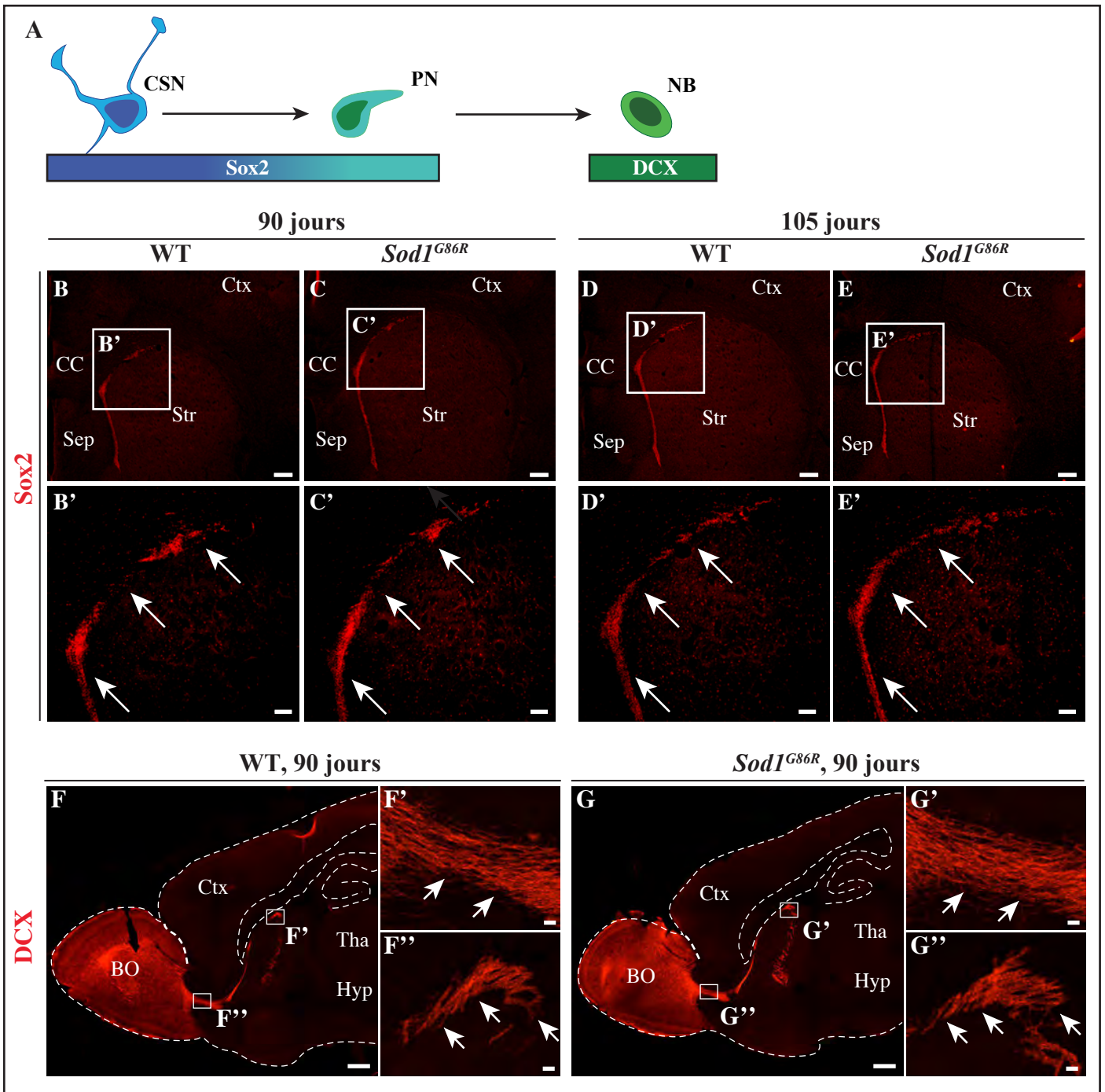
### **I. Les populations cellulaires impliquées dans la neurogénèse adulte émanant de la ZSV sont préservées au cours de la pathologie chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>***

Afin de déterminer l'état des différentes populations cellulaires impliquées, au sein de la ZSV, dans la neurogénèse des bulbes olfactifs (BO) du cerveau de souris, c'est à dire les cellules souches neurales (CSN), progéniteurs neuronaux (PN) et neuroblastes (NB), j'ai révélé la présence de ces populations au moyen de marqueurs, ou combinaisons de marqueurs par immunofluorescence (Figure 3 et Tableau 1), sur des coupes coronales à trois niveaux rostro-caudal et à quatre âges : 30 jours, 60 jours (pré-symptomatiques), 90 jours et 105 jours (symptomatiques), chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et leurs contrôles sauvages (n=4 WT et 4 *Sod1<sup>G86R</sup>* à chaque âge) (Figure 1E). Pour chaque expérience d'immunofluorescence, un contrôle négatif, sans anticorps primaire, a été réalisé pour s'assurer de la spécificité des marquages. Les analyses aux âges 30 et 60 jours n'ont pas révélé de différences entre les animaux WT et *Sod1<sup>G86R</sup>*, et j'ai choisi de ne montrer que les résultats obtenus aux âges symptomatiques de 90 et 105 jours. Par ailleurs, pour des raisons d'espace, j'ai choisi de ne montrer que les images des coupes rostrales.

#### **1. Le co-marquage GFAP/Nestine révèle une perte spécifique du signal Nestine dans les CSN et PN de la ZSV chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>***

En absence de marqueur unique des CSN, j'ai choisi de révéler cette population grâce à la combinaison des marqueurs GFAP/Nestine (Figure 4A). La GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), un filament intermédiaire de type III, est exprimé classiquement par les astrocytes (Kamphuis et al., 2012), mais également, au sein de la ZSV par les CSN (Doetsch et al., 2002).





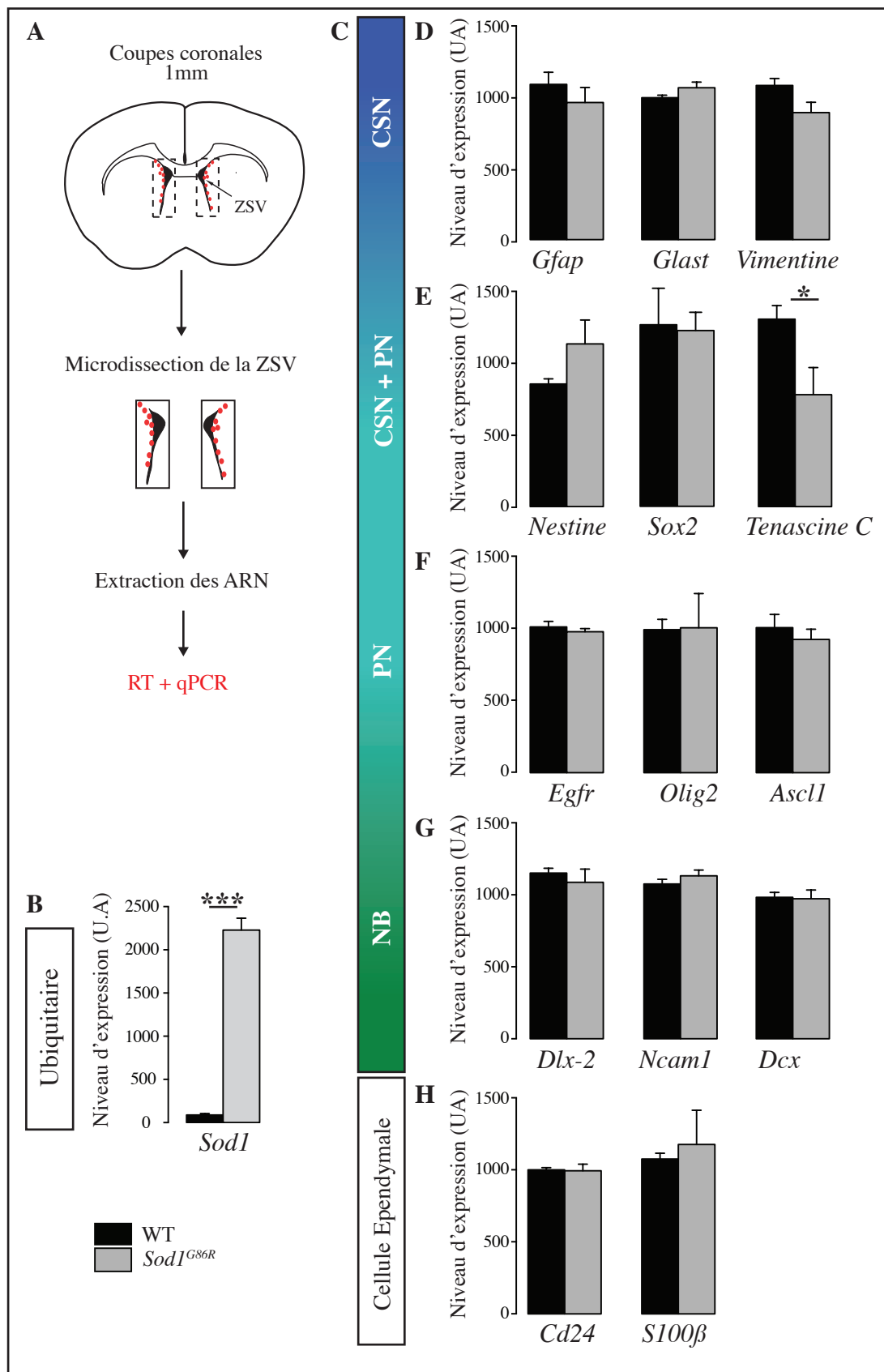
**Figure 5 : L'expression de Sox2, un marqueur de progéniteurs neuronaux et de cellules souches neurales, et de DCX, un marqueur de neuroblastes et neurones en migration, n'est pas altérée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*.**

A) Schéma de l'expression des marqueurs Sox2 par les cellules souches neurales (CSN) et progéniteurs neuronaux (PN) de la zone sous-ventriculaire (ZSV) et de DCX par les neuroblastes (NB) de la ZSV migrant via le flux migratoire rostral (FMR) vers les bulbes olfactifs (BO). B-E) Images de microscopie représentatives de coupes coronales de cerveaux de souris sauvages (WT) et transgéniques (*Sod1<sup>G86R</sup>*) aux âges symptomatiques de 90 jours (gauche) et de 105 jours (droite), au niveau de la ZSV, après révélation de Sox2, un marqueur de progéniteurs neuronaux et de cellules souches neurales. B'-D') Agrandissements au niveau de la ZSV. Notez le maintien des niveaux de Sox2 chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* en comparaison aux WT, indiqué par les flèches pleines. F,G) Images de microscopie représentatives de coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages (WT) et transgéniques (*Sod1<sup>G86R</sup>*) à 90 jours, au niveau du FMR, après révélation de DCX, un marqueur de neuroblastes et neurones en migration. F',F'',G',G'') Agrandissements au niveau de la ZSV (F',G') et de la partie rostrale du FMR (F'',G''). Les flèches pleines indiquent un marquage maintenu. BO: bulbe olfactif; CC: corps calleux; Ctx: cortex; DCX: doublecortine; Hyp: hypothalamus; Sep: spetum; Str: striatum; Sox2: SRY (sex determining region Y)-box 2; Tha: thalamus. Echelle : 600 $\mu$ m (F,G), 150 $\mu$ m (B-E) et 20 $\mu$ m (B',C',D',E',F',F'',G',G'').

Comme attendu, le marquage GFAP révèle un signal fort le long du ventricule latéral, où se situent les CSN, et un signal plus diffus au sein du corpus calleux, émanant des astrocytes (Figure 4B-C). La Nestine, un filament intermédiaire de type IV, est exprimée, au sein de la ZSV, à la fois par les CSN et les PN (Doetsch et al., 1997) (Figure 4A-C). La combinaison GFAP/Nestine, au sein de la ZSV, permet donc de révéler la population de CSN. Une analyse à plus fort grossissement des parties dorsale et ventrale de la ZSV révèle des niveaux de GFAP équivalents entre les souris WT et *Sod1<sup>G86R</sup>* aussi bien à 90 jours qu'à 105 jours (Figure 4D-G et H-K, respectivement). En revanche, on note une nette diminution des niveaux de Nestine dans la ZSV des souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, aussi bien dans la partie dorsale que dans la partie ventrale, présente dès l'âge de 90 jours (Figure 4D',E' et H',I', respectivement) et accentuée à 105 jours (Figure 4F',G' et J',K', respectivement). Ce résultat a été retrouvé et confirmé dans les régions intermédiaires et caudales de la ZSV également étudiées (résultats non montrés). Deux scénarios pourraient expliquer le maintien des niveaux de GFAP et la diminution du marquage Nestine chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* comparées aux WT : 1) un maintien de la population de CSN (qui expriment GFAP et Nestine) et une diminution spécifique de la population de PN (qui expriment Nestine mais pas GFAP), ou 2) un maintien des populations de CSN et PN, accompagné d'une diminution de leurs niveaux protéiques de Nestine (baisse transcriptionnelle et/ou traductionnelle).

## **2. L'expression du marqueur de CSN et PN, Sox2, est maintenue chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>***

Pour déterminer si, et comment, la population de PN est affectée par la pathologie chez les *Sod1<sup>G86R</sup>*, c'est à dire pour déterminer si le nombre de PN est diminué ou au contraire si le nombre de PN est maintenu mais que l'expression de la Nestine par les PN est diminuée, j'ai réalisé un troisième marquage, à l'aide d'un anticorps dirigé contre le facteur de transcription Sox2 (Sex determining region Y-box 2). Dans le cerveau de souris adulte, Sox2 est exprimé à la fois par les CSN et les PN de la ZSV (Figure 5A), ainsi que par les astrocytes (Brazel et al., 2005). En outre, il est nécessaire au maintien des propriétés d'auto-renouvellement des CSN (Brazel et al., 2005). L'immunoréactivité de Sox2 révèle un marquage fort le long de la ZSV, typique des CSN et PN, et un marquage plus diffus au sein du striatum, typique des astrocytes, chez les souris WT et *Sod1<sup>G86R</sup>*, aussi bien à 90 jours qu'à 105 jours (Figure 5B-E). L'analyse à plus fort grossissement du marquage Sox2, le long de la ZSV, ne révèle pas de différence entre les deux génotypes comparés, WT et *Sod1<sup>G86R</sup>*, aux quatre âges étudiés (30 et 60 jours non



**Figure 6 : La quantification de l'expression des gènes exprimés par les divers sous-types cellulaires de la zone sous-ventriculaire (ZSV) suggère que la niche neurogénique n'est que faiblement affectée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* à 90 jours.**

**A)** Schéma de la technique utilisée pour extraire les ARN de la ZSV de souris sauvages et transgéniques à 90 jours (n=5 WT et n=5 *Sod1<sup>G86R</sup>*). **B)** L'expression de *Sod1* a été utilisée pour vérifier le génotype des animaux et l'efficacité de la qPCR. **C)** Schéma des différents sous-types cellulaires du système ZSV-FMR-BO. **D-H)** Résultats de qPCR réalisées avec les amorces spécifiques des transcrits exprimés par les différents sous-types cellulaires du système ZSV-FMR-BO. Notez une baisse significative de l'expression de la Tenascin C, \*p<0,05. CSN: cellules souches neurales; PN: progéniteurs neuronaux; NB: neuroblastes; WT : sauvage. Les noms des gènes sont définis dans la liste des abréviations, ainsi que dans la légende de la Figure 3.

montrés), notamment aux âges symptomatiques de 90 et 105 jours (Figure 5B',C' et D',E', respectivement).

Dans son ensemble, cette première analyse suggère que les populations de CSN et PN sont maintenues, au sein de la ZSV des souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, et ce, même à des âges symptomatiques. La perte du marquage Nestine, dans un contexte où les autres marqueurs de CSN et PN sont maintenus, suggère une diminution de l'expression de la Nestine, qui pourrait résulter de modifications transcriptionnelles et/ou traductionnelles.

### **3. L'expression du marqueur de NB et neurones en migration, DCX, est maintenue chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>***

Après les CSN et PN, le troisième type cellulaire impliqué dans la neurogénèse des neurones du bulbe olfactif (BO) est celui des neuroblastes (NB) (Figures 5A), qui ont la particularité de migrer, depuis la ZSV vers le BO le long du flux migratoire rostral (FMR). Cette migration des NB nécessite l'expression de DCX (doublecortine) une protéine associée aux microtubules (Couillard-Despres et al., 2005), et utilisée ici comme marqueur de la population de NB le long du FMR (Figure 5A), par immunofluorescence. Pour pouvoir observer les NB positifs pour la DCX le long de l'intégralité du FMR, j'ai sectionné selon le plan sagittal les cerveaux de souris sauvages et transgéniques (n=3 WT et n= 4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), à l'âge de 90 jours, un âge de début de symptômes et le premier âge auquel la baisse de Nestine est observée. La comparaison des images de cerveaux de souris WT et *Sod1<sup>G86R</sup>*, aussi bien à faible grossissement (Figure 5F,G) qu'à plus fort grossissement au niveau de la ZSV (Figure 5F',G') et du coude formé par le FMR avant son entrée dans le BO (Figure 5F'',G''), n'a révélé aucune différence entre les deux génotypes. Ce résultat suggère qu'à 90 jours la migration des NB de la ZSV vers le BO est un processus qui n'est pas affecté par la progression de la maladie chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, comparées aux WT.

## **II. A 90 jours, les modifications de la niche neurogénique que constitue la ZSV sont très discrètes.**

De manière globale, le système ZSV-FMR-BO ne semble pas affecté chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Pour déterminer si des altérations plus discrètes pouvaient avoir lieu, j'ai réalisé une microdissection de la ZSV afin de procéder à une analyse quantitative de l'expression de gènes exprimés par les différentes populations cellulaires de la ZSV, à l'âge de 90 jours, qui correspond chez ces animaux au début de la phase symptomatique (n=5 WT et n=5 *Sod1<sup>G86R</sup>*; Figure 6A). Dans un premier temps, afin de tester la qualité de mon approche par PCR

quantitative (qPCR) et de vérifier le génotype des animaux, j'ai réalisé une qPCR avec des amorces oligonucléotidiques spécifiques du gène murin de la *superoxyde dismutase 1 (Sod1)*, et vérifié la surexpression attendue (Figure 6B). J'ai ensuite déterminé l'expression de gènes spécifiques des différents sous-types cellulaires de la ZSV (Figure 6C).

L'expression des marqueurs des CSN/PN, tels les gènes *Gfap*, *Vimentine*, et *Nestine*, qui codent pour différents types de filaments intermédiaires, de *Glast (Glutamate Aspartate Transporter)*, ou encore de *Sox2*, n'est pas modifiée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* en comparaison à leurs contrôles sauvages (Figure 6D,E). De manière intéressante, le maintien des niveaux d'expression de *Nestine* suggère que la baisse observée au niveau protéique (Figure 4) aurait une origine traductionnelle ou post-traductionnelle, et non transcriptionnelle.

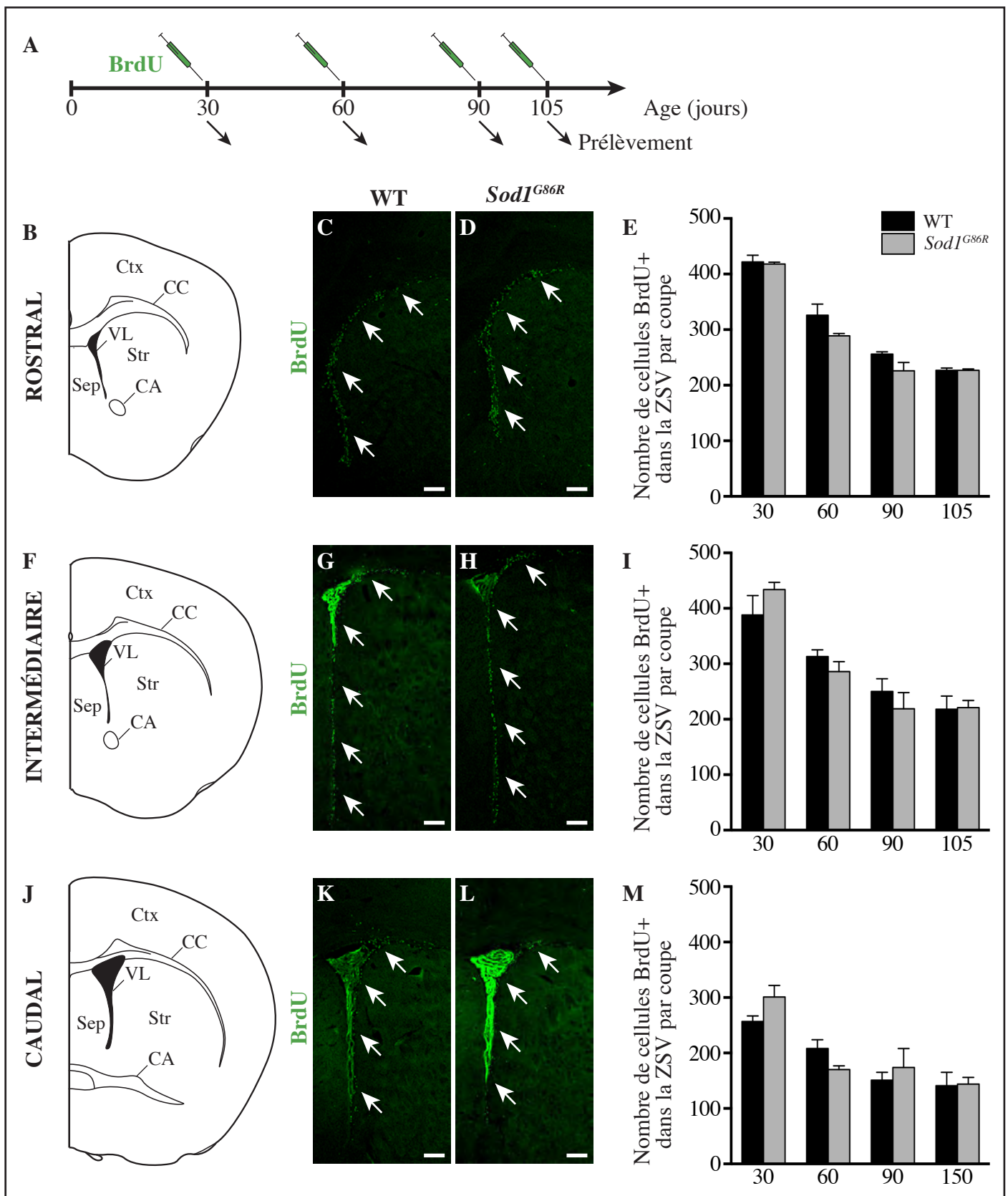
Contrairement aux autres marqueurs de CSN/PN, l'expression de la *Tenascine C*, qui code pour une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, sécrétée par les CSN et les PN (Garcion et al., 2004) est significativement diminuée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* ( $777,45 \pm 188,21$  pour les *Sod1<sup>G86R</sup>* contre  $1\ 302,10 \pm 93,96$  pour les WT). Ce résultat suggère une altération de l'intégrité de la matrice extra-cellulaire de la ZSV chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, comparées à leurs contrôles sauvages.

Enfin, les marqueurs de PN, tels *Egfr (Epidermal Growth Factor Receptor)*, *Olig2 (Oligodendrocyte transcription factor 2)* et *Ascl1 (Achaete-scute homolog 1)* (Doetsch et al., 2002; Parras et al., 2004; Marshall, 2005; Roybon et al., 2009), les marqueurs de NB, tels *Dlx2 (Distal less homeobox-2)*, *NCAM1 (Neural Cell Adhesion Molecule 1)* et *Dcx* (Seki and Arai, 1993; Doetsch et al., 2002), ainsi que les marqueurs de cellules épendymales *Cd24* et *S100 $\beta$*  (Mirzadeh et al., 2008) apparaissent inchangés (Figure 6F,G,H).

Dans son ensemble, cette analyse moléculaire comparative de la ZSV des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et de leurs contrôles sauvages, à 90 jours, confirme l'absence de changements drastiques des populations de CSN, PN et NB à cet âge, et révèle une modification de l'expression d'un gène encodant une protéine de la matrice extracellulaire et sécrétée par les CSN et PN, *Tenascine C*.

### **III. Les capacités prolifératives des CSN et PN de la ZSV sont préservées chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>***

Le maintien des populations de CSN, PN et NB au niveau de la ZSV et du FMR observé chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* suggère un maintien de leurs capacités prolifératives. En effet, une baisse des capacités prolifératives des CSN aurait un impact sur la population de PN, et une baisse des capacités prolifératives des PN aurait un impact sur la population de NB. Pour



**Figure 7 : La prolifération cellulaire au niveau de la zone sous-ventriculaire n'est pas affectée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*.**

**A)** Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour déterminer la prolifération cellulaire : une injection unique de BrdU (50mg/Kg) a été administrée 2 heures avant le sacrifice des animaux et le prélèvement des cerveaux, à 30 jours (n=4 WT; n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 60 jours (n=4 WT; n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 90 jours (n=4 WT; n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) et 105 jours (n=4 WT; n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*). **B,F,J)** Représentation schématique des coupes coronales au niveau desquelles la quantification des cellules positives pour le BrdU a été réalisée. **C,D,G,H,K,L)** Images représentatives de coupes coronales contenant les zones sous-ventriculaires (ZSV), issues d'animaux âgés de 90 jours, et sur lesquelles le BrdU a été révélé par immunofluorescence. En fonction des coupes, le plexus choroïde peut apparaître très autofluorescent. **E,I,M)** Quantification du nombre de cellules positives pour le BrdU présentes dans la ZSV, en fonction de l'âge et du génotype, au niveaux rostral (E), intermédiaire (I) et caudal (M). L'âge et la localisation rostro-caudale ont un effet sur la prolifération cellulaire. Le génotype en revanche n'en a pas. BrdU: 5-bromo 2'-désoxyuridine; Ctx: cortex; Sep: septum; Str: striatum; CC: corps calleux; CA: commissure antérieure; VL: ventricule latéral; WT: sauvage. Echelle: 125 $\mu$ m.

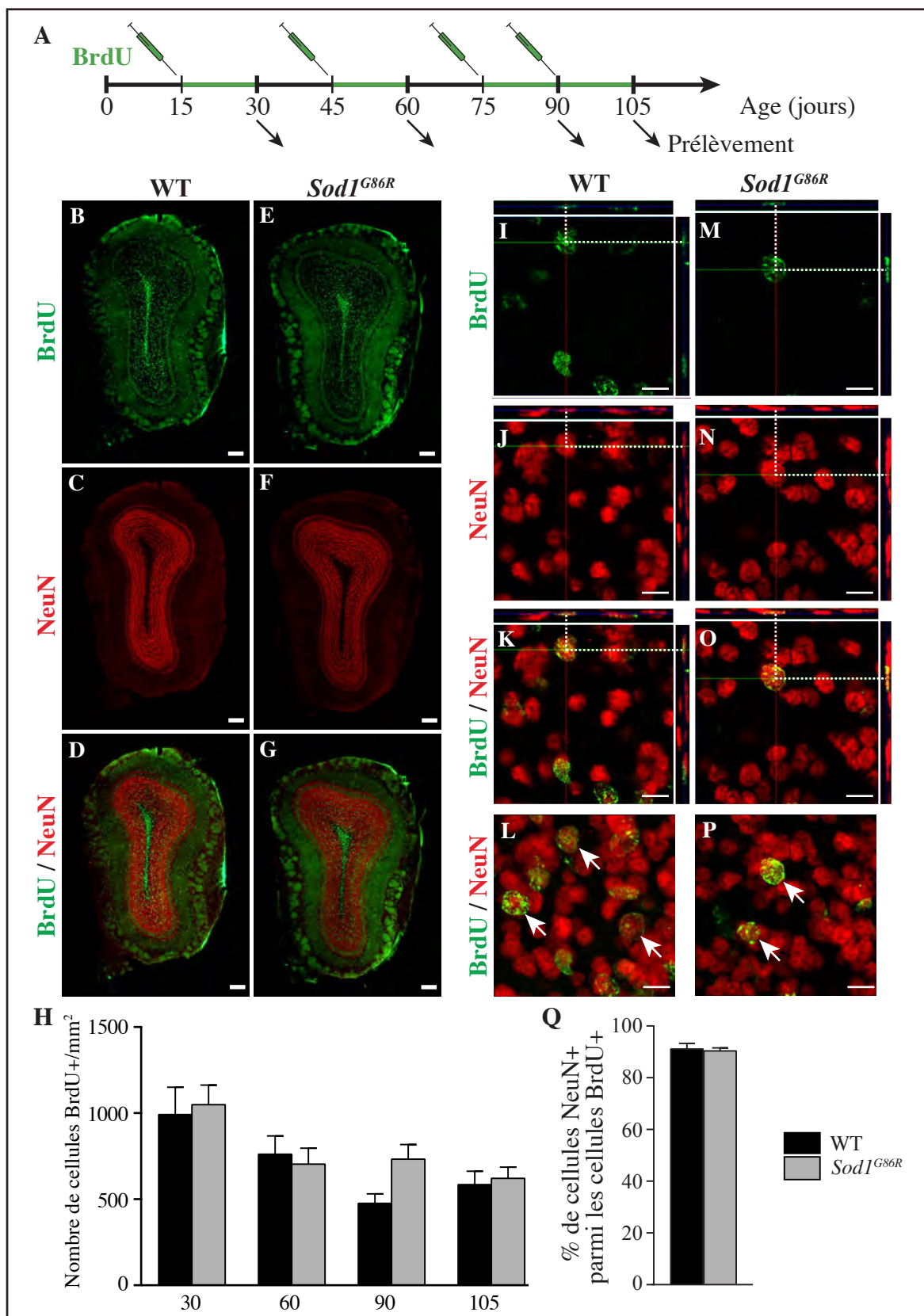
vérifier que la prolifération des CSN et PN n'est pas affectée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, et confirmer le maintien des populations de CSN, PN et NB précédemment observé chez ces animaux, j'ai réalisé une quantification de la prolifération cellulaire. Pour ce faire, j'ai injecté une dose unique de BrdU (50mg/Kg) 2h avant le sacrifice des animaux à 30, 60, 90 et 105 jours (n=4 WT et n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>* à chaque âge) (Figure 7A). Ce protocole permet de marquer spécifiquement les cellules étant entrées en phase S, entre le moment de l'injection du BrdU et celui du prélèvement des tissus qui se trouvent dans les régions prolifératives (Doetsch et al., 1999; Liu and Martin, 2006). Le BrdU a été révélé par immunofluorescence à trois niveaux de la ZSV : rostral, intermédiaire et caudal (Figure 7B,F,J). Le même protocole d'immunofluorescence, réalisé sur des tissus provenant d'animaux non-injectés au BrdU n'a révélé aucun signal, comme attendu (contrôle négatif, résultat non montré).

Deux heures après injection la ZSV des souris sauvages et les transgéniques démontrent une capacité robuste d'absorption du BrdU le long des axes dorso-ventral et rostro-caudal (Figure 7C,D,G,H,K,L), en accord avec les travaux précédemment publiés (Luskin, 1993). J'ai quantifié le nombre de cellules positives pour le BrdU à chaque âge, pour chaque niveau rostro-caudal étudié, et pour les deux génotypes, WT et *Sod1<sup>G86R</sup>* d'intérêt (Figure 7E,I,M). Pour chaque génotype, l'analyse de variance à deux facteurs a permis de mettre en évidence un effet rostro-caudal significatif ( $p < 0,001$  ; Figure 7E,I,M), avec en moyenne 40% de cellules en moins au niveau caudal comparé au niveau rostral, ainsi qu'un effet de l'âge ( $p < 0,001$  ; Figure 7E,I,M), avec en moyenne 40% de cellules en moins à 90 jours par rapport à 30 jours, comme précédemment rapportés (He and Crews, 2007; Azim et al., 2012). Ces effets, déjà bien décrits, de la localisation anatomique et de l'âge sur la prolifération des cellules de la ZSV adulte valident la qualité de l'approche de quantification choisie. En revanche, les analyses de variance à deux facteurs réalisées à chacun des niveaux rostro-caudal ne mettent en évidence aucune différence significative entre les souris WT et *Sod1<sup>G86R</sup>* (Figure 7E,I,M), démontrant que les capacités prolifératives des cellules de la ZSV ne sont pas affectées par la mutation, et/ou la progression de la maladie chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*.

#### **IV. Les capacités neurogéniques du système ZSV-FMR-BO sont préservées chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>***

Pour étudier les capacités neurogéniques du système ZSV-FMR-BO, j'ai réalisé un marquage et une quantification, au niveau des BO, des cellules générées au cours des deux semaines précédant le sacrifice des animaux à 30 jours (n=2 WT et n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 60 jours (n=4 WT et n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 90 jours (n=5 WT et n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) et 105 jours (n=4 WT et n=5





**Figure 8 : La neurogénèse au niveau des bulbes olfactifs (BO) n'est pas affectée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*.**

**A**) Schéma de l'approche expérimentale utilisée pour estimer la neurogénèse des BO: une injection quotidienne de BrdU (180mg/Kg) 15 jours avant le sacrifice des animaux et le prélèvement des cerveaux à 30 jours (n=2 WT; n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 60 jours (n=4 WT; n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*), 90 jours (n=5 WT; n=4 *Sod1<sup>G86R</sup>*) et 105 jours (n=4 WT; n=5 *Sod1<sup>G86R</sup>*). **B-G**) Images représentatives de coupes coronales de BO, issues d'animaux âgés de 90 jours, et sur lesquelles le BrdU (vert) et le marqueur neuronal NeuN (rouge) ont été révélés par immunofluorescence. **H**) Quantification des cellules positives pour le BrdU dans les BO de souris, en fonction de l'âge et du génotype. Notez l'effet de l'âge, et l'absence d'effet du génotype. **I-P**) Images de microscopie confocale (z-stack I-K et M-O et projections L et P) représentatives de coupes coronales de BO, issues d'animaux âgés de 90 jours. Les flèches indiquent les cellules positives pour les deux marqueurs. **Q**) Quantification des cellules positives pour neuronal nuclei (NeuN), parmi les cellules positives pour le BrdU, réalisée à l'âge de 90 jours. 90% des cellules positives pour le BrdU expriment le marqueur neuronal NeuN, indépendamment du génotype. BrdU: 5-bromo 2'-désoxyuridine; WT: sauvage. Echelle : 125 $\mu$ m pour B-G et 10 $\mu$ m pour I-P.

*Sod1<sup>G86R</sup>*). Pour ce faire, une dose quotidienne de BrdU (180mg/Kg) a été administrée aux animaux avant le prélèvement des cerveaux (Figure 8A). La quantification des cellules positives pour le BrdU a été réalisée dans toutes les couches du BO (Figure 8B,E) : la couche glomérulaire, la couche plexiforme externe, la couche de cellules mitrales, la couche plexiforme interne et la couche des cellules granulaires (Lledo et al., 2008). Pour standardiser les résultats de comptage, le nombre de cellules positives pour le BrdU a été rapporté à l'aire de chaque couche, et les résultats ont été pondérés pour donner une moyenne de cellules par mm<sup>2</sup> dans l'ensemble du BO (Figure 8H).

L'analyse de variance à deux facteurs des cellules positives pour le BrdU et présentes dans le BO des souris montre un effet significatif de l'âge ( $p < 0,001$ ), mais pas du génotype. Ces résultats suggèrent que la génération de cellules, par le système ZSV-FMR-BO, n'est pas spécifiquement affectée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* en comparaison à leurs contrôles sauvages.

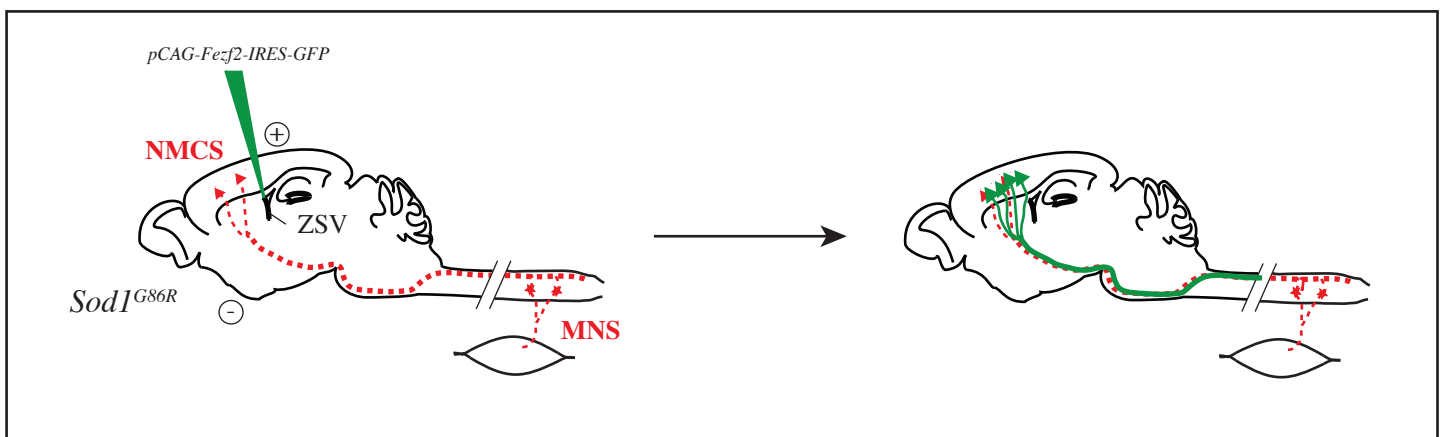
Parce que le marquage au BrdU ne permet pas, à lui seul, de discriminer entre neurones et glies, j'ai combiné le marquage BrdU à un marquage NeuN (Neuronal Nuclei), exprimé par les neurones post-mitotiques (Mullen et al., 1992). Pour déterminer la proportion de neurones parmi les cellules positives pour le BrdU, j'ai quantifié, à l'âge de 90 jours, le nombre de cellules NeuN+/BrdU+. Des exemples de cellules doublement positives sont donnés par les images de microscopie confocale (Figure 8I-P). Les résultats de quantification de co-marquage montrent qu'à 90 jours, 90% ces cellules positives pour le BrdU sont également positives pour NeuN, et qu'il n'y a pas de différence entre les souris transgéniques et sauvages. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la neurogénèse des neurones du BO n'est pas affectée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* par rapport à leurs contrôles sauvages.

Marqueur	Type cellulaire	<i>Sod1<sup>G86R</sup></i>	<i>hSod1<sup>G93A</sup></i>
GFAP	CSN	→	↘
<i>Gfap</i>	CSN	→	n.t.
<i>Glast</i>	CSN	→	n.t.
Vimentine	CSN	n.t.	↘
<i>Vimentine</i>	CSN	→	n.t.
Nestine	CSN et PN	↘	↘
<i>Nestine</i>	CSN et PN	↗	n.t.
<i>Tenascine C</i>	CSN et PN	↘	n.t.
<i>Sox2</i>	CSN et PN	→	n.t.
<i>Sox2</i>	CSN et PN	→	n.t.
<i>Egfr</i>	PN	→	n.t.
<i>Olig2</i>	PN	→	n.t.
<i>Ascl1</i>	PN	→	n.t.
<i>Dlx2</i>	PN et NB	n.t.	→
<i>Dlx2</i>	PN et NB	→	n.t.
PSA-NCAM	NB	n.t.	↗
<i>Ncam1</i>	NB	→	n.t.
DCX	NB	→	n.t.
<i>Dcx</i>	NB	→	n.t.
Prolifération (BrdU 2 heures)		→	↘
Neurogenèse (BrdU 15 jours)		→	↘

**Tableau 3 : Analyse comparative des résultats obtenus sur des modèles murins *Sod1<sup>G86R</sup>* et *hSod1<sup>G93A</sup>* (Liu and Marin, 2006).**

- ↗ Augmentation
- ↘ Diminution
- Niveaux inchangés

BrdU: 5-bromo 2'-désoxyuridine; CSN: cellules souches neurales; NB: neuroblastes; n.t.: non traité; PN: progéniteurs neuronaux. Les noms des gènes sont définis dans la liste des abréviations, ainsi que dans la légende de la Figure 3.



**Figure 9 : Schéma de la stratégie thérapeutique envisagée pour régénérer les neurones moteurs cortico-spinaux (NMCS) chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*.**

Dans un premier temps, la capacité du facteur de transcription Fezf2 (Fez family zinc finger 2) à induire la génération de NMCS à partir des cellules souches neurales/progéniteurs neuronaux (CSN/PN) de la zone sous-ventriculaire (ZSV) sera testée : un plasmide encodant le gène Fezf2 et le gène rapporteur GFP (Green fluorescent protein) sera injecté de manière stéréotaxique au sein de la ZSV, puis électroporé dans les CSN. Dans un deuxième temps, l'effet des NMCS issus des CSN sera testé sur les symptômes de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*.

## DISCUSSION

Les travaux que j'ai menés au cours de mon stage de Master ont eu pour but de caractériser l'état de la zone sous-ventriculaire (ZSV) dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique (SLA), les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Plus spécifiquement, j'ai cherché à déterminer si les populations de cellules souches neurales (CSN) et de progéniteurs neuronaux (PN), qui constituent cette niche neurogénique, étaient maintenues en dépit de l'environnement neurodégénératif caractéristique de la SLA, et si leurs qualités prolifératives et neurogéniques étaient préservées. Cette question est fondamentale en ce qu'elle permet de déterminer si la ZSV pourrait constituer, au sein du cerveau de souris adultes, et en conditions neurodégénératives, une source de cellules potentiellement programmables afin d'induire la génération, *de novo* et *in situ*, de populations neuronales d'intérêt thérapeutique. Dans le cas de la SLA, il s'agirait d'utiliser les CSN/PN de la ZSV pour permettre la régénération des neurones moteurs cortico-spinaux (NMCS), une population de neurones excitateurs glutamatergiques, situés dans la couche V du cortex moteur, et assurant la transmission de l'influx nerveux du cortex à la moelle épinière. Mes travaux, bien que préliminaires, permettent d'ores et déjà de conclure que la ZSV n'est pas dramatiquement affectée par le déclenchement et la progression de la maladie chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, et que le maintien des populations de CSN et PN de la ZSV permet d'envisager dès à présent une toute première régénération des NMCS en conditions de SLA.

### **Les populations de CSN et PN de la ZSV sont conservées chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>***

Au sein du système nerveux central, rares sont les marqueurs qui permettent d'identifier à eux seuls, une population cellulaire unique, c'est pourquoi l'emploi de combinaisons de marqueurs est nécessaire pour déterminer l'état d'une population cellulaire donnée. Pour analyser l'état des CSN et PN de la ZSV les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, au cours de la maladie, j'ai analysé l'expression de combinaisons de marqueurs par des approches *i*) qualitatives d'immunofluorescence à des stades présymptomatiques (30 et 60 jours) et symptomatiques (90 et 105 jours) et *ii*) quantitatives de qPCR, à l'âge de 90 jours.

L'expression des marqueurs de populations de CSN et PN tels la protéine GFAP et des gènes *Gfap*, *Glast* et *Vimentine* (Doetsch et al., 1997) n'est pas affectée (Figures 4,6 et Tableau 3) chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* comparées à leurs contrôles sauvages. De même, l'expression de la protéine *Sox2* et des gènes *Sox2*, *Egfr*, *Olig2* et *Ascl1*, qui marquent au sein de la ZSV la population de PN (Doetsch et al., 2002; Parras et al., 2004; Brazel et al., 2005; Marshall, 2005; Roybon et al., 2009), demeure inchangée (Figures 5,6 et Tableau 3). Ces données, dans leur

ensemble, suggèrent que les populations de CSN et de PN sont maintenues chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, et ce, même à des stades symptomatiques de la maladie.

De manière intéressante, les niveaux protéiques de Nestine, un filament intermédiaire de type IV exprimé par les CSN et PN de la ZSV, baissent à 90 et 105 jours (Figure 4 et Tableau 3), alors que les niveaux d'expression de son gène sont maintenus à 90 jours (Figure 6E et Tableau 3). Ces résultats suggèrent que la baisse observée de protéine Nestine, au sein de la ZSV, ne relève pas d'une altération transcriptionnelle, mais plus probablement d'altérations de la traduction de son ARN messager, ou encore d'une dégradation post-traductionnelle de la protéine. La génération de souris knockout pour le gène de la *Nestine* a permis de mettre en évidence son rôle dans la survie et le renouvellement des CSN/PN (Park et al., 2010). Cependant, les conséquences d'une perte tardive de la Nestine au sein de la ZSV, par le biais par exemple d'une lignée knockout conditionnelle, n'ont à ma connaissance pas été établies. Il est donc, en l'état actuel des recherches, difficile de statuer sur la signification d'une baisse spécifique des niveaux de protéine Nestine, au sein de populations de CSN/PN par ailleurs conservées.

J'ai également observé une diminution significative de l'expression de la *Tenascine C* (Figure 6E et Tableau 3), un gène qui encode une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, sécrétée par les CSN et les PN. Bien que la *Tenascine C* ait été initialement décrite comme impliquée dans le maintien de la niche neurogénique (Garcion et al., 2004), de récents travaux démontrent que les souris knockout pour la *Tenascine C* présentent un nombre similaire de CSN/PN à celui des contrôles sauvages, et que la capacité des CSN/PN à régénérer leur population après traitement à l'inhibiteur de synthèse de l'ADN, cytosine-beta-D-arabino-fluranoside, est conservée malgré l'absence d'expression de la *Tenascine C* (Kazanis et al., 2007).

Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que, chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, les CSN/PN de la ZSV sont sujets à de discrètes variations d'expression de gènes ou protéines, mais que ces variations n'ont pas de conséquence directe à l'échelle des populations.

### **Les CSN et PN sont fonctionnels et la neurogénèse est préservée chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>***

Pour confirmer ces premiers résultats faisant état d'un maintien des populations de CSN et PN de la ZSV chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, et pour déterminer si ces populations cellulaires demeuraient fonctionnelles à des niveaux similaires à ceux du cerveau de souris sauvage, j'ai utilisé trois approches complémentaires. D'une part, j'ai comparé les capacités prolifératives des cellules de la ZSV de souris *Sod1<sup>G86R</sup>* à celles de leurs contrôles sauvages à quatre stades, asymptomatiques et symptomatiques de la maladie. D'autre part, j'ai évalué l'état de la

population cellulaire en aval des PN, les neuroblastes (NB), et leurs propriétés migratoires le long du flux migratoire rostral (FMR), à l'âge de 90 jours. Finalement, j'ai comparé le nombre de neurones post-mitotiques présents dans le bulbe olfactif (BO), à différents stades de la maladie, chez les souris sauvages et transgéniques.

L'injection de BrdU deux heures avant le sacrifice des animaux, et le comptage successif des cellules positives pour le BrdU au sein de la ZSV, est une méthode classique de détermination des capacités prolifératives des CSN et PN (Doetsch et al., 1999; Liu and Martin, 2006). Mes résultats mettent en évidence une diminution des capacités prolifératives des CSN et PN de la ZSV en fonction de l'âge, et en fonction de leur localisation le long de l'axe rostro-caudal (Figure 7), comme précédemment décrit (Luskin, 1993), et ce, aussi bien chez les souris sauvages que chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. En revanche, je n'ai mesuré aucune différence entre les animaux transgéniques et sauvages (Figure 7 et Tableau 3), suggérant que les capacités prolifératives des CSN/PN de la ZSV ne sont pas altérées par le déclenchement, la progression de la maladie, ou la surexpression ubiquitaire d'un mutant inactif du gène *Sod1*.

Afin d'évaluer l'état de la population de NB, issus des PN, j'ai comparé les niveaux d'expression, au sein de la ZSV, de gènes sélectifs des NB, tels *Dlx2*, *Ncam1* ou *Dcx*, chez les souris sauvages et transgéniques. En accord avec les résultats précédents suggérant un maintien des populations de CSN et de PN, et un maintien de leurs capacités prolifératives, j'ai constaté un maintien de la population de NB (Figure 6 et Tableau 3). Par ailleurs, l'immunodétection de la doublecortine (DCX), le long du FMR des souris transgéniques et sauvages ne fait apparaître aucune différence (Figure 5 et Tableau 3), et suggère que les NB conservent leurs capacités migratoires.

Enfin, j'ai estimé le nombre de neurones générés sur une plage de temps donnée et présents dans le BO, pour estimer les capacités neurogéniques du système ZSV-FMR-BO des souris *Sod1<sup>G86R</sup>* à des stades présymptomatiques et symptomatiques. J'ai pu constater, aussi bien chez les souris transgéniques que chez les souris sauvages, une diminution de la neurogénèse des BO au cours du temps, mais aucune différence significative entre les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* et leurs contrôles sauvages (Figure 8).

Dans leur ensemble, ces résultats démontrent que les populations de CSN, PN, NB et neurones du BO, ainsi que les capacités prolifératives des CSN et PN, et migratoires des NB, sont globalement insensibles à la surexpression du transgène *Sod1<sup>G86R</sup>*, à la neurodégénérescence qui a cours dans le cortex cérébral avoisinant, et plus généralement au déclenchement et à la progression de la maladie dans le modèle murin *Sod1<sup>G86R</sup>* de SLA.

## **Une différence marquée entre les modèles murins *Sod1*<sup>G86R</sup> et *hSod1*<sup>G93A</sup>**

La découverte d'un premier gène associé aux formes familiales de SLA a permis l'émergence de nombreux modèles murins (Turner and Talbot, 2008). Parmi eux, la lignée de souris surexprimant le gène humain muté en position G93A (*hSod1*<sup>G93A</sup>), est de loin la plus représentée dans la littérature scientifique. Cependant, ce modèle présente deux faiblesses : *i*) le choix d'un gène humain, plutôt que murin, *ii*) et le maintien de l'activité enzymatique de la SOD1 mutée. En effet, les souris surexprimant le gène humain sauvage, *hSod1*, présentent une neurotoxicité qui ne peut être attribuée à une mutation retrouvée chez les patients SLA (Turner and Talbot, 2008). C'est pour cette raison que l'unité INSERM 1118, au sein de laquelle j'ai effectué mon stage de Master, a fait le choix de travailler avec la lignée de souris *Sod1*<sup>G86R</sup> qui surexprime une forme mutée et inactive du gène murin, équivalente à la mutation G85R identifiée chez certains patients SLA (Ripps et al., 1995).

De manière intéressante, une étude de l'état de la ZSV menée il y a quelques années sur le modèle *hSod1*<sup>G93A</sup> a conclu en une altération des populations de la ZSV, ainsi qu'une diminution de la neurogénèse du BO (Liu and Martin, 2006). En effet, les auteurs ont observé, par immunohistochimie, une diminution des marqueurs de CSN/PN, GFAP, Vimentine et Nestine, une diminution de leurs capacités prolifératives, et une baisse très marquée de la neurogénèse du BO, allant jusqu'à 75% de neurones générés en moins aux stades avancés de la maladie (Liu and Martin, 2006) (Tableau 3). Si ce phénotype, très marqué, est en totale opposition avec mes résultats, il est cependant difficile de l'attribuer entièrement à la mutation G93A. En effet, Liu et Martin ont également étudié, en qualité de contrôle, la lignée *hWTSod1*, qui surexprime le gène humain sauvage de la SOD1. A l'instar des souris *hSod1*<sup>G93A</sup>, les souris *hWTSod1* présentent une diminution des marqueurs de CSN/PN GFAP, Vimentine et Nestine, comparé aux souris sauvages, même si l'effet est moindre et moins consistant que chez les *hSod1*<sup>G93A</sup> (Liu and Martin, 2006). Mais de manière plus frappante, la baisse drastique de la neurogénèse dans le BO observée chez les souris *hSod1*<sup>G93A</sup> est retrouvée, à des niveaux similaires (une diminution de 80%) chez les souris *hWTSod1* (Liu and Martin, 2006). Ces résultats suggèrent que le phénotype observé chez les souris *hSod1*<sup>G93A</sup> est en grande partie attribuable à la surexpression d'une forme humaine et active du gène Sod1, plutôt qu'à une mutation mise en évidence chez certains patients SLA, qui, pour sa part, n'induit pas d'augmentation de l'activité SOD1.

## **Une pertinence qui reste à déterminer**

A l'heure actuelle, il est encore difficile de tester la pertinence de nos résultats, et ceux obtenus avec la lignée *hSod1*<sup>G93A</sup>, car l'étude des niches neurogéniques et de la neurogénèse



adulte chez les patients SLA reste à effectuer. Il existe cependant une étude unique, réalisée sur une seule patiente, atteinte de SLA et dégénérescence fronto-temporale (DFT), n'ayant reçu aucun traitement, et dont l'évolution de la maladie a été extrêmement rapide (un an) (Galan et al., 2011). Les résultats montrent une augmentation, dans la ZSV, du nombre de cellules en division, corrélée à une augmentation des marqueurs de CSN et PN. Il n'a pas été établi si, sur le plan fonctionnel, cet effet était corrélé à une augmentation de la neurogénèse (Galan et al., 2011). D'autres études, menées sur un plus grand nombre de patients, atteints de SLA uniquement, et dont l'évolution de la maladie aura été plus en adéquation avec les chiffres classiques (3 à 5 ans), seront nécessaires pour permettre de dégager une conclusion générale sur l'état des niches neurogéniques et de la neurogénèse adulte chez les patients atteints de SLA.

### **Perspectives**

Les résultats de mon étude permettent de conclure que les populations de CSN et PN de la ZSV sont maintenues chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*, et que leurs propriétés prolifératives et neurogéniques sont préservées, et ce, même à des stades avancés de la maladie. La présence de CSN et PN fonctionnels, au cœur d'un cerveau souffrant par ailleurs d'une dégénérescence sélective des NMCS, permet d'envisager la mobilisation de cette niche neurogénique à des fins régénératives. En effet, il est possible de générer, *in vivo*, dans le cerveau d'embryons de souris, une population ectopique de NMCS, à partir des cellules souches neurales embryonnaires de l'éminence ganglionnaire latérale (EGL) (Rouaux and Arlotta, 2010), qui donnent normalement naissance aux neurones moyens épineux du striatum. Cette programmation des CSN embryonnaires de l'EGL résulte de la simple surexpression d'un facteur de transcription « maître », *Fezf2* (Fez family zinc finger 2), dont l'expression est par ailleurs nécessaire à la spécification des NMCS au cours de la corticogénèse (Molyneaux et al., 2005). En outre, la surexpression de *Fezf2* suffit également à reprogrammer, *in vivo*, des neurones post-mitotiques (les neurones calleux des couches supérieures du cortex cérébral) en NMCS (Rouaux and Arlotta, 2013). Ces résultats, combinés à mes travaux de Master, suggèrent qu'il serait possible d'induire, par surexpression de *Fezf2*, la génération de NMCS à partir de CSN adultes de la ZSV. C'est cette première stratégie de régénération d'une population neuronale d'intérêt thérapeutique que je me propose à présent de tester dans le modèle murin de SLA que sont les souris *Sod1<sup>G86R</sup>* (Figure 9).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Azim K, Fiorelli R, Zweifel S, Hurtado-Chong A, Yoshikawa K, Slomianka L, Raineteau O (2012) 3-Dimensional Examination of the Adult Mouse Subventricular Zone Reveals Lineage-Specific Microdomains. *PLoS ONE* 7:e49087.
- Brazel CY, Limke TL, Osborne JK, Miura T, Cai J, Pevny L, Rao MS (2005) Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* 4:197–207.
- Chen J, Magavi SSP, Macklis JD (2004) Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16357–16362.
- Chen J, Zhou L, Pan S-Y (2014) A brief review of recent advances in stem cell biology. *Neural Regen Res* 9:684.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn H-G, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21:1–14.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97:703–716.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *J Neurosci* 17:5046–5061.
- Doetsch F, Petreanu L, Caillé I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron* 36:1021–1034.
- Galan L, Gomez-Pinedo U, Vela-Souto A, Guerrero-Sola A, Antonio Barcia J, Rabano Gutierrez A, Martinez-Martinez A, Barquero Jimenez MS, Manuel Garcia-Verdugo J, Matias-Guiu J (2011) Subventricular zone in motor neuron disease with frontotemporal dementia. *Neurosci Lett* 499:9–13.
- Garcion E, Halilagic A, Faissner A, French-Constant C (2004) Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131:3423–3432.
- Hamilton LK, Joppé SE, M Cochard L, Fernandes KJL (2013) Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here. *Eur J Neurosci* 37:1978–1986.
- He J, Crews FT (2007) Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacol Biochem Behav* 86:327–333.
- Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, VandenBerg S, Alvarez-Buylla A (2006) PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51:187–199.
- Jessberger S, Toni N, Clemenson GD, Ray J, Gage FH (2008) Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 11:888–893.
- Kamphuis W, Mamber C, Moeton M, Kooijman L, Sluijs JA, Jansen AHP, Vermeer M, de Groot LR, Smith VD, Rangarajan S, Rodríguez JJ, Orre M, Hol EM (2012) GFAP Isoforms in Adult Mouse Brain with a Focus on Neurogenic Astrocytes and Reactive Astrogliosis in Mouse Models of Alzheimer Disease. *PLoS ONE* 7:e42823.
- Kazanis I, Belhadi A, Faissner A, French-Constant C (2007) The Adult Mouse Subependymal Zone Regenerates Efficiently in the Absence of Tenascin-C. *J Neurosci* 27:13991–13996.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC (2011) Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 377:942–955.
- Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW (2013) Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* 79:416–438.
- Liu Z, Martin LJ (2006) The adult neural stem and progenitor cell niche is altered in amyotrophic lateral sclerosis mouse brain. *J Comp Neurol* 497:468–488.
- Lledo P-M, Merkle FT, Alvarez-Buylla A (2008) Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 31:392–400.

- Luskin MB (1993) Restricted Proliferation and Migration of Postnatally Generated Neurons Derived from the Forebrain Subventricular Zone. *Neuron* 11:173–189.
- Marshall CAG (2005) Olig2 Directs Astrocyte and Oligodendrocyte Formation in Postnatal Subventricular Zone Cells. *J Neurosci* 25:7289–7298.
- Ming G-L, Song H (2011) Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70:687–702.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell* 3:265–278.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Hirata T, Hibi M, Macklis JD (2005) Fez1 is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* 47:817–831.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201–211.
- Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di C-G, Liu X-M, Shao Y, Ma B-F, Lee J-H, Ha K-S, Walton N, Lahn BT (2010) Nestin Is Required for the Proper Self-Renewal of Neural Stem Cells. *Stem Cells* 28:2162–2171.
- Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F (2004) Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J* 23:4495–4505.
- Renton AE, Chiò A, Traynor BJ (2013) State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 17:17–23.
- Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:689–693.
- Rouaux C, Arlotta P (2010) Fezf2 directs the differentiation of corticofugal neurons from striatal progenitors in vivo. *Nat Neurosci* 13:1345–1347.
- Rouaux C, Arlotta P (2013) Direct lineage reprogramming of post-mitotic callosal neurons into corticofugal neurons in vivo. *Nat Cell Biol* 15:214–221.
- Roybon L, Deierborg T, Brundin P, Li J-Y (2009) Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 29:232–243.
- Seki T, Arai Y (1993) Distribution and possible roles of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* 17:267–290.
- Shaw PJ (2005) Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:1046–1057.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang S-M, Goderie SK, Roysam B, Temple S (2008) Adult SVZ Stem Cells Lie in a Vascular Niche: A Quantitative Analysis of Niche Cell-Cell Interactions. *Cell Stem Cell* 3:289–300.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F (2008) A Specialized Vascular Niche for Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3:279–288.
- Turner B, Talbot K (2008) Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 85:94–134.
- Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F (2002) Elimination of Primer-Dimer Artifacts and Genomic Coamplification Using a Two-Step SYBR Green I Real-Time RT-PCR. *Anal Biochem* 303:95–98.
- Winner B, Kohl Z, Gage FH (2011) Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33:1139–1151.
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell* 132:645–660.

## Détermination du rôle des neurones corticospinaux dans le déclenchement et la progression de la sclérose latérale amyotrophique chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie se caractérisant par la dégénérescence progressive et conjointe des neurones corticospinaux (NCS) et des motoneurones (MN) bulbaires et spinaux. Des études chez les patients suggèrent une origine corticale et une propagation corticofuge de la pathologie. Cependant, cette hypothèse n'a jamais été démontrée chez les patients SLA ni testée dans les modèles murins. Ces travaux ont permis de tester le rôle des neurones à projections subcérébrales (NPSC) dans le déclenchement et la progression de la SLA chez les souris *Sod1<sup>G86R</sup>*. Nous avons alors généré un nouveau modèle murin développant la SLA en absence de NPSC. Les résultats montrent que l'absence de NPSC retarde le déclenchement de la pathologie, prolonge la survie des animaux, tout en réduisant le déclin de leurs capacités motrices. Ces données suggèrent que l'absence de NPSC est bénéfique et que, dans un contexte de SLA, les NPSC seraient donc toxiques et auraient un rôle prépondérant dans le déclenchement et l'établissement de la SLA. Ces travaux montrent l'importance d'inclure l'étude des NCS pour le développement de futures stratégies thérapeutiques.

**Mots clés :** Sclérose latérale amyotrophique ; Neurones corticospinaux ; Cortex cérébral ; *Sod1<sup>G86R</sup>* ; *Fezf2* ; Hypothèse corticofuge.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a disease characterized by progressive and combined degeneration of corticospinal neurons (CSN) and bulbar and spinal motoneurons (MN). Studies in patients suggest a cortical origin and a corticofugal spread of the pathology. However, this hypothesis has never been demonstrated in ALS patients nor tested in mouse models. The work of this thesis allowed to test the role of subcerebral projection neurons (SCPN) in the onset and progression of ALS in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice. To do so, we generated a new mouse model developing ALS in the absence of SCPN. Results show that the absence of SCPN delays the onset of the pathology, prolongs the survival of the animals, while reducing the decline of their motor abilities. These data suggest that the absence of SCPN is beneficial and that, in an ALS context, SCPN would be toxic and have a preponderant role in the onset and establishment of the pathology. This work shows the importance of including the CSN study for the development of future therapeutic strategies.

**Keywords:** Amyotrophic lateral sclerosis; corticospinal neurons; cerebral cortex; *Sod1<sup>G86R</sup>*; *Fezf2*; Corticofugal hypothesis.