

### Modulations du métabolisme et de l'autophagie induites par l'exercice physique dans un modèle souris de sclérose latérale amyotrophique (SLA)

Céline Desseille

#### ► To cite this version:

Céline Desseille. Modulations du métabolisme et de l'autophagie induites par l'exercice physique dans un modèle souris de sclérose latérale amyotrophique (SLA). Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT: 2015USPCB129. tel-02562453

### HAL Id: tel-02562453 https://theses.hal.science/tel-02562453

Submitted on 4 May 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 Paris Descartes

### Ecole doctorale ED3C, ED 158

UMR-S 1124 / Equipe Dégénérescence et plasticité neuromusculaire

# Modulations du métabolisme et de

l'autophagie induites par l'exercice

physique dans un modèle souris de

# sclérose latérale amyotrophique (SLA)

Par Céline Desseille

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Frédéric Charbonnier

Présentée et soutenue publiquement le 27 novembre 2015

Devant un jury composé de :

Pr. Frédéric Charbonnier (Directeur de thèse) Dr. Sophie Nicole (Rapporteur) Pr. François Jérome Authier (Rapporteur) Dr. Gaëlle Bruneteau Pr. Xavier Coumoul



© (i) (creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/









#### Modulations du métabolisme et de l'autophagie induites par l'exercice physique dans un modèle souris de sclérose latérale amyotrophique (SLA)

De plus en plus d'études suggèrent un rôle important du métabolisme énergétique dans la pathogenèse de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Ainsi, une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline et un hypermétabolisme lipidique sont très souvent retrouvés chez les patients et dans les modèles animaux de SLA. Cependant, les bases cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces altérations restent largement méconnues. Une récente étude menée dans un modèle souris de SLA, indique qu'un dysfonctionnement de la pyruvate déshydrogénase (PDH) induirait, dans les muscles rapides, un déséquilibre des voies cataboliques vers une utilisation privilégiée des lipides, et non plus du glucose. Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer dans quelles mesures un programme ciblé d'exercice physique pourrait réorienter les voies métaboliques vers une utilisation privilégiée du glucose dans les souris SOD1(G93A), modèle de SLA. Nous avons comparé les effets de deux types d'entraînement, l'un basé sur un exercice de course de faible intensité, assimilable à un exercice d'endurance, l'autre basé sur un exercice de nage à forte intensité, assimilable à un exercice de force/résistance. Contrairement à la course, l'exercice de nage réduit significativement l'intolérance au glucose, augmente le taux sanguin de lactate et le stockage lipidique dans les adipocytes. Dans le muscle rapide tibialis, touché très précocement par la maladie, nous mettons en évidence une altération de l'expression de GLUT4, transporteur musculaire majeur du glucose, et de la glyceraldehyde-3 phopshate deshydrogenase (GAPDH), une enzyme clé de la glycolyse. Ces altérations moléculaires sont retrouvées dans des biopsies musculaires de patients SLA. L'entraînement à la nage des souris SLA stimule l'expression de GLUT4 et de GAPDH, grâce à la réactivation de processus d'autophagie, et réactive les enzymes du métabolisme aérobie, telles que la citrate synthase, enzyme du cycle de Krebs, et la cytochrome oxydase, appartenant à la chaîne respiratoire mitochondriale. Quoique moins efficace, l'entraînement à la course induit des effets similaires à la nage. De manière intéressante, l'ensemble de ces adaptations s'effectue indépendamment d'une modulation de PDH. Enfin, dans le tibialis des souris SLA, l'entraînement à la nage stimule l'expression des transporteurs des lipides, Vldlr et Cd36, ainsi que l'expression d'enzymes lipogéniques telles que Fas et Dgat1, cette dernière étant connue dans les muscles, pour coupler la synthèse des lipides et de la lipolyse. Ces adaptations sont corrélées à une augmentation significative de la quantité des triglycérides musculaires.

L'ensemble de ces données indique qu'un exercice bien calibré peut améliorer le métabolisme énergétique dans un contexte de SLA, et ouvre la voie à une utilisation de l'exercice physique en complément d'une potentielle modulation pharmacologique de la PDH chez les patients.









La science ne marche pas d'une manière continue, elle a de longues oscillations

28 janvier 1929, Pierre Janet

Tout ce qui aujourd'hui est une réalité faisait auparavant partie d'un rêve impossible

Williiam Blake









### Remerciements

La thèse est une étape importante dans la vie estudiantine. J'ai eu la chance de pouvoir en réaliser une et réussir à la finir. C'est donc l'heure de passer aux remerciements.

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury, Sophie Nicole et François-Jérôme Authier pour avoir apporté un regard critique sur le manuscrit et permettre ainsi qu'il ne soit qu'encore meilleur. Gaëlle Bruneteau avec qui j'ai eu la chance de discuter science au cours de ma thèse et qui m'a permis d'y intégrer un aspect humain, et Xavier Coumoul, le dernier cité mais pas des moindres, il a contribué à une très légère et petite mise au point du métabolisme des lipides, connaissances quelques peu oubliées à la fin de ma licence.

Un dernier membre du jury, mais aussi un élément central de ma thèse, Frédéric Charbonnier. Il a été, à la suite de Claude Pariset, mon directeur de thèse pour les deux années restantes, me permettant ainsi d'entr'apercevoir le monde de la recherche. Je tiens tout d'abord à te remercier d'avoir cru en moi lorsque, à la fin d'une conférence, je suis venue te voir pour te dire que je voulais faire mon M2 dans ton laboratoire ; j'étais alors en stage d'électrophysiologie et je savais que je voulais m'orienter en biologie moléculaire et cellulaire. En acceptant de me prendre en stage tu m'as permis d'allier mon « travail » et ma passion du sport. C'était un peu comme revenir quelques années en arrière et ne plus regretter de ne pas avoir fait STAPS. D'autre part, grâce à la multidisciplinarité des expériences, j'ai pu acquérir une expérience professionnelle importante, bagage nécessaire pour la suite de mon objectif professionnel. J'ai eu la chance aussi de travailler sur deux pathologies très intéressantes, et d'avoir un aspect des neurosciences moins central et tout autant, voir même plus, fascinant. La promiscuité des gens au labo, dûe au faible effectif, permet de nombreux échanges et des temps de repas toujours vivants.

Quand je quitterai le laboratoire, cela fera 5 ans que j'y travaillerais. C'est autant d'années qui m'ont permis de passer de jeune ado/adulte à une personne épanouie et armée des outils nécessaires pour démarrer dans le monde professionnel.



Je remercie aussi l'ensemble des membres de l'équipe. Tout d'abord un grand Merci à Olivier Biondi (merci de m'avoir conseillé au beach et laissé gagner contre ton équipe en tournois), trève de plaisanterie, vu que tu n'es pas des plus sensibles sur les compliments et les remerciements juste merci d'avoir pris le temps de me former et de me conseiller, et d'avoir essayé, malgré tes nombreuses occupations, de m'accorder du temps lorsque je te le demandais (il me reste quand même à apprendre photoshop). Merci à Laure Weill, dernière arrivée, mais tes nombreux et précieux conseils m'ont permis d'améliorer mon travail (cependant tout le monde ne sait pas travailler en musique !). Un grand remerciement à Léo Houdebine, que je plains pas mal en ce moment car il compense mes manipes quand le temps me manque. Merci de me supporter même si ce n'est pas des plus évident, après toi en stress pour l'école doctorale, il y aura eu moi et ma thèse, au final que peu de temps avec nous deux détendus. Bon courage pour la suite de ta thèse, mais tout se passera bien (et promis maintenant je peux t'aider pour anibio !). Merci à Philippe Lopes, la première personne avec qui j'ai commencé à travailler dans ce labo, envoie de fichier de sommeil à Marseille et projet de stage aux USA. Tu m'as donné quelques maux de têtes au départ, des journées entières à parler en anglais et entendre de l'anglais c'était trop dur, et maintenant me voilà, 4 ans plus tard, partant à un congrès aux USA sans aucune appréhension pour la langue anglaise. Merci de ta douceur et gentillesse, toujours le mot encourageant et toujours de bonne humeur même si avoir des jumelles en bas âge n'est pas évident tous les jours.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Ensuite les absents, Farah Chali, Julien Branchu, de nombreux stagiaires tout autant agréables les uns et les autres, avec un pensée particulière pour Marie Collet (Félicitation pour le mariage) Claire Tromilin (même si tu trouvais la paillasse anxiogène tu te débrouillais très bien, mais tu sembles très heureuse dans tes nombreux projets), Lise Bertin (je crois qu'une soirée à la Bodega restera gravée dans ma mémoire, toujours la motivation pour sortir ou découvrir de nouveaux pointsde-vue), Valentina (je compte bien un jour venir à Rome puis après en Sicile,) et Alexandra Bouscary (petite dernière arrivée, mais je sens que l'année qui arrive va être forte en émotion et en technique de vernis).





Dans la continuité des gens de l'équipe, un sincère remerciement pour Anne Sophie Armand. Nous avions bien commencé nos interactions, un petit couack de parcours a rendu les échanges un peu moins fugaces, mais heureuse de pouvoir rediscuter avec toi, avoir tes conseils et tes points de vue, partager des moments ensemble. Mes joggings ne sont pas les tenues les plus sexy mais il n'y a rien de plus conformable, et, avec du sport tous les jours, je peux me l'autoriser de temps en temps !

Suzie, notre canadienne, je te remercie d'être comme tu es, avec une compréhension de la culture française et des points-de-vue souvent argumentés, je me fais plaisir à parler avec toi. Toujours prête à aider et à ma donner des conseils qui sont très précieux. Cela va me manquer quand je vais partir. Je n'hésiterai pas à t'envoyer quelques mails pour bénéficier de cette source de savoir que tu as accumulée au cours de tes années d'expériences.

Perrine, tu fais partie depuis peu du laboratoire mais ca fait quand même 5 ans que je te côtoie. Bon courage pour ta carrière H&S, tu vas avoir du fil à retordre.

Sylvie, je ne peux pas faire des remerciements sans t'y inclure, tu es certes à la retraite maintenant (tandis que d'autres démarrent dans la vie) mais je tiens à te remercier de tout ce que tu as pu faire pour moi, et c'était un régal de discuter des voyages avec toi (il faut vraiment que j'aille à Berlin). En ce qui te concerne, tu as déjà un mot avec tous mes remerciements dans ton petit carnet !

Joël, beaucoup de choses à te dire. Merci de t'occuper de mes souris aux entraînements, cela me fait gagner un temps précieux, merci d'être fidèle à toi-même et d'avoir le compliment facile. Je te le promets, je resterai moi-même au maximum, souriante et avenante pour mettre de la bonne humeur dès le lever du soleil.

Antonin, merci de ton aide sur toute l'analyse des lipides. 3 jours à Saint Antoine où je n'ai pas osé compter le nombre de tubes que j'ai préparé ( >600). J'espère que l'année qui arrive sera plus tranquille au niveau des émotions. Bon courage pour l'ensemble des tes projets et HLPC c'est l'avenir !!!





Un grand merci à tous les autres membres de l'équipe et ceux affiliés, Christophe Chanoine, Tristan Gonçalves (sans faute normalement) (pour nos sorties sportives passées et futures) Delphine Sapaly, Bruno Dela Gaspera, Claure Pariset.

Je ne pourrai pas faire de bons remerciements en oubliant l'équipe 8 ou l'équipe des « Charbelleux ». Depuis que je suis arrivée elle a bien évoluée mais l'ambiance est toujours restée agréable. Pour certains, vous avez su apprécier la cuisine maison et vous m'avez permis de m'amuser un petit peu ! Sinon un merci tout particulier à Delphine Meffre, pour nos petites histoires et lorsque nous avons du temps les rares cafés ensemble (toujours agréable), et Julien Grenier (depuis notre première discussion j'ai direct accroché au personnage que tu étais !!). Merci à Sophie Bernard, et Merhnaz Jafarian pour leurs conseils avisés, Charbel Massaad pour ses signatures et notre petite entreprise de TP de biologie à des primaires, Françoise Courtin pour les discussions de randonnées, et aussi les nombreux thésards, Gemma, Elena, Alex, Nirmal (la plus belle des filles (i sorry but i should do, to never forget our « hello »), Stéphanie avec qui je dois visiter le liban, et une mention spéciale à Mehdi Hichor (que dire de plus que MERCI, d'avoir été là, d'avoir été toi et de nos moments de « bataille »). Une petite mention pour l'incontournable GG et son pays magnifique (profite bien des US). Enfin dans cette équipe un merci à la super maman Julia, où nous avons su amener cette amitté hors du labo !

Pour toute l'importance que prennent les souris dans ma thèse, un grand merci à Claire Mader pour l'aide et les discussions qui ont agrémentés cette thèse. Je pense avoir tout eu, maintenant où que j'aille je serai parée.

Pour clore les remerciements aux gens de Paris Descartes, un grand merci à un bon nombre de personnes de l'unité, de m'avoir aidée dans les manipes mais aussi dans les connaissances, afin de me donner toutes les armes nécessaires à la réalisation de ce travail de thèse. Mention spéciale à Sylvie Bortoli pour tous ces moments que tu m'as accordés et tous ces produits que tu m'as prêtés !





Merci à Robert Barouki, notre directeur de l'unité, de m'avoir permis de réaliser avec succès ce fameux Famlab qui restera une expérience très enrichissante autant sur l'organisation que sur l'exercice scientifique que cela représente.

Merci à Karine T pour m'avoir fait découvrir la fonctionnalité des pauses café et tout le temps futur qui sera gagné pour les manipes. Je n'oublierai jamais ton optimisme sur le coffre d'une petite voiture ! Bon courage pour la suite !

Et une dernière pensée aux thésards qui soutiennent la même semaine que moi, Ludmila et Elise qui partagent les craintes et le stress de cette présentation de clôture !





Maintenant je m'attaque à la partie la plus sensible et émotive. Remercier les gens du laboratoire c'est remercier des gens qui me supportent que depuis 4 ans, mais les amis c'est un peu plus long.

Comme certains le disent, je suis une handicapé des sentiments alors je vais essayer de laisser un peu de coté mon handicap et Chloé m'a fait travailler les déclarations d'amour amicales donc je me lance.

Les premiers remerciements reviennent tout naturellement à Michèle Souyri. Que dire, tu as réussi, en l'espace d'à peine quinze jours, changer une aversion en une passion. Je ne suis pas sure que beaucoup de gens puissent se vanter de cela. Merci d'être toi, merci d'avoir TOUJOURS était là. A l'époque on m'avait fait remarquer que j'étais la seule stagiaire que tu tutoyais, et j'en suis très fière. Je me souviens de nombreux souvenirs avec toi, notamment la comparaison d'une photo de ma sœur et moi avec une feuille d'érable et tu m'as sorti une photo presque pareille que tu avais prise sauf que c'était une vache. Je pense qu'à partir de ce moment, nous avions cassé de nombreuses barrières. J'ai choisi la neuroscience mais certaines fois je me suis demandais ce que cela aurait donné de faire une thèse avec toi. Je rentre aujourd'hui dans la vie professionnelle mais je sais que j'aurai toujours un appui en ta personne et que, quoiqu'il arrive, où que je sois, je peux compter sur toi, seul le moyen de communication variera !

Les seconds remerciements vont à 'César'. Ceux qui me connaissent comprendront de qui il s'agit. Ma détermination à finir cette thèse je te la dois. Qu'importe la vie à venir, je te remercie des moments que nous avons pu partager et de ton soutien.

Désolée papa et maman, mais je vais d'abord étaler de la crème sur le dos de ma sœur ! Karine, Karine Karine, on est complètement folle toutes les deux et quand on est ensemble ce n'est pas mieux que séparée. Tu as vécu à l'autre bout du monde pour me fuir mais tu as loupé, on se donne plus de nouvelles que quand on vivait sous le même toit. Que ferai-je sans toi ? La même chose certes mais en étant perdue. Merci de tes cadeaux débiles de notre Noël de douze heures, de tes cadeaux plus marquants, le Belem, la topaze, les perles et j'en passe, merci pour la reine des





neiges, un deuxième Disney où je ne retiens pas mes larmes. Et puis tu ne l'as peut être pas oublié mais on se doit respectivement la vie (salto arrière dans une piscine et gaz allumé !!!) Alors je vais te dire un grand merci d'avoir perdu ton temps à lire et corriger ma thèse en orthographe et syntaxe ! Je ne t'ai fait corriger qu'un rapport mais au final je t'ai donné plus de travail que tu ne m'en as jamais donné. Et même si la maison de sens s'écroule on aura quand même une super fosse septique ! Trêve de plaisanterie, juste merci et je ne te promets pas que je ne ferai pas une deuxième thèse car si la folie me prend je te veux bien comme nouvelle correctrice.

Papa et Maman, c'est un peu dur certaines fois tous les trois, mais merci de me soutenir financièrement malgré mes projets et mes folies et me permettre quelques loisirs qui ne sont pas de tout repos ! Maman m'a expliqué qu'un jour, je n'étais pas très vieille, j'ai fait demi tour car je n'étais pas capable de franchir un obstacle, depuis, non pas que vous ne soyez pas tenaillés par la peur, mais vous m'avez laissé faire tout ce que je souhaitais en ayant confiance en moi. Et c'est pour cela que je vous remercie, de croire en moi et de me porter vers l'avant !

Merci à toute ma famille, que vous soyez là aujourd'hui compte énormément pour moi. C'est tellement agréable d'avoir une famille unie et présente.

Chloé, je ne sais même pas par où commencer. Heureusement que tu es là, tu me soutiens, tu me supportes, tu m'encourages, tu me rationalises, tu fais attention à ma santé, tu me divertis et tu m'apportes une quantité d'amitié ENORME ! Alors pour que cette déclaration reste gravée sur internet et dans les archives ouvertes françaises, Je tiens à toi et je t'aime très fort !! (je ne pourrai pas faire mieux en terme de déclaration, je suis à l'apogée de mon apprentissage).

Ma Li, ca fait tellement longtemps qu'on avance ensemble, on a choisi d'avancer sur un rythme différent, et d'ici une semaine on fête les deux ans déjà de ton petit bonhomme. Mais on a réussi, malgré ces vies différentes, à ne pas trop s'éloigner et à être là dans les moments clés ! On reliera ces quelques phrases dans cinquante ans assises sur un banc (j'aurai peut être eu des enfants d'ici là !)





Dans la continuité des amis parents, ou futurs parents, une grande pensée à toi Lipstri, pour m'avoir permi d'évoluer et grandir. Nos vies avancent et n'en deviennent que plus belles, Merci !

Mes cancres, dénomination pratique pour parler de vous. Depuis de Lycée et toujours là au moindre événement. Je vous adore, et je suis très heureuse de vous comptez parmi mes amis. On a chacun un job différent, et c'est très agréable, même si parfois je ne comprends pas tout, d'entendre des sujets de discussions à des années lumières de la recherche c'est fort plaisant. Merci à toute la famille Siegl aussi, Sylvie, Sophie et Fanny avec qui j'ai passé de nombreux moments à raconter ma thèse ou mes histoires !

De Saint Louis-Saint Clément, je n'oublie surtout pas ma « Grde Sœur » et Audric.

J'ai gardé que peu de personnes de la prépa mais les meilleurs, mon Adri et ADSL la plus patiente des coloc, quand j'y repense je me demande comment on a tenu sans s'engueuler.

Le Lavandou a apporté aussi son lot d'amitié, Bb mickey (ça ne le fait plus trop maintenant que tu es papa !) Sandra ma c\*\*\*\*\*, jeannette !! merci à tous pour tous les inoubliables moments à la plage ou à la ville.

Merci aussi à ces quelques personnes qui ont égayé ma vie marseillaise. Célia et Cédric mes deux amis, et le groupe de trentenaires, vous me donniez envie d'avoir trente ans ! A toi Jen pour tous ces moments plus ou moins furtifs qu'on arrive à avoir ensemble, et ces discussions plus qu'enrichissantes.

Je n'ai pas oublié les années fac à Orsay. Ah Manu.... De toute manière peu de chance que tu lises ces lignes mais ta folie est géniale ! Fred et Jay, deux rescapés grâce aux techniques de communications et Lounes un retrouvé, merci au hasard qui s'est acharné.

Et puis dernière étape Paris Descartes, où j'ai découvert une personne géniale, Lulu. Je t'ai « choquée » au premier regard, tu m'as « choquée » aux premières conversations personnelles mais nous voilà au bout de ces trois ans. Merci de m'avoir épaulée quand il a fallu, de m'avoir prété les





connaissances de ton chef. Merci pour ces moments passés et futurs, et même si tu n'es pas une accro des textos il faudra que tu t'y mettes quand je partirai !!!

Un merci à Fred de m'avoir encouragée et soutenue ces derniers temps alors que c'était dur et déprimant et à monsieur lapin, de m'avoir fait relativisé les faux plans !

Merci à Martin pour ma culture cinématographique, maintenant je vais avoir un peu plus de temps pour reprendre ta liste !

Merci à ma NAM, pour ces moments partagés et tous ceux à venir.

Merci au beach volley, j'entends par là toutes les amitiés présentes et futures que la pratique sportive peut m'apporter. Ainsi qu'un grand merci à ma super KINE, Océane qui m'a soulagée de nombreux maux dont sa technique miracle pour l'épaule est une véritable aubaine pour le reste de ma vie !

Merci à mon dimère d'enzyme (alias Meryem), à ma chouchou (Juliette) et un dernier merci à toutes les personnes qui ont croisé ma vie et que j'ai eu envie de convier à cet événement. Si aujourd'hui j'ai réussi à clore mes études par une thèse c'est que vous m'avez permis de garder la tête sur les épaules, et m'avez divertie.

Et un dernier merci à toute ma famille qui me supporte depuis toujours, ainsi que les « faux » cousins !!!









## Table des matières

1. lr	ntroduction
1.	Définition générale
2.	Manifestation clinique de la SLA 29
1.	Les symptômes
2.	Diversité de la SLA
3.	Epidemiologie
4.	Diagnostic
3.	Traitements en cours d'étude 43
2. L	es modèles animaux
1.	Modèle murin
1.	Modèle SOD1(G93A) 47
2.	Autres modèles murins SLA 49
3.	Autres modèles animaux51
3. F	Physiopathologie de la SLA53
1.	Complexité de la physiopathologie de la SLA53
2.	Les altérations dues à la protéine SOD153
1.	Agrégats toxiques et protéine SOD1 54
2.	Modulation de l'édition des ARN 55
3.	Modulation de la conformation des protéines 55
4.	Perturbation du fonctionnement des organites
5.	Modulation calcique et excitotoxicité glutamatergique
6.	Autres voies conduisant à l'apoptose 57
4. C	Drigine cellulaire de la SLA58
1.	L'unité motrice





1.	Les différentes unités motrices62
2.	Atteintes de l'unité motrice dans la SLA 63
3.	Atteintes des motoneurones 64
4.	Atteintes des jonctions neuromusculaires
5.	Atteintes des muscles 66
2.	Les cellules gliales
1.	Cellules myélinisantes 67
2.	Atteinte des cellules myélinisantes dans la SLA 67
3.	Cellules non myélinisantes 68
4.	Atteintes des cellules non myélinisantes
5. N	létabolisme énergétique dans la SLA70
1.	Perturbation de l'homéostasie du glucose dans la SLA
1.	Les transporteurs du glucose : GLUT471
2.	Altération du métabolisme glucidique dans la SLA
2.	AMPK : carrefour métabolique régulant le métabolisme énergétique 73
1.	Rôles biologiques
2.	AMPK et SLA75
3.	Hypermétabolisme lipidique dans la SLA
1.	Les lipides : Les acides gras76
2.	Altération du métabolisme lipidique dans la SLA
4.	Altération du processus d'autophagie dans la SLA
1.	La micro-autophagie79
2.	L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA) 79
3.	La macro-autophagie 80
4.	Régulation de l'autophagie et voies de signalisation
5.	Autophagie et SLA

### UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES



5	5.	Conclusion métabolisme énergétique 86
6.	Ľ	exercice physique
1		L'exercice physique dans les maladies neurodégénératives
2	2.	Adaptations physiologiques à l'exercice physique
	1.	Plasticité du muscle à l'exercice physique
	2.	Adaptation au stress oxydant91
	3.	Adaptation du métabolisme énergétique92
	4.	Autophagie et exercice physique94
3	8.	L'exercice physique dans la SLA94
	1.	Programme d'exercice physique chez les patients SLA
	2.	Exercice physique et modèle murin95
	3.	Effets différents de l'exercice de nage et l'exercice de course 96
7.	Pr	roblématique 101
8.	Ar	ticle : Specific exercise can efficiently reverse the metabolic switch
ancoung c		Introduction article
2	)	Conclusion article
9	 ΔΝ	MPK au centre des modulations, du métabolisme énergétique, induites
par l'exerc	cice p	bhysique dans le <i>tibialis</i> d'un modèle souris SOD1(G93A)
1		Introduction
2	2.	Matériels et méthodes 162
	1.	Modèle murin 162
	2.	Entraînements 162
	3.	Prélèvements 163
	4.	Analyse protéique : le western immuno blot (WIB) 163
	5.	Analyse transcriptionnelle : la RT-qPCR 165
	6.	Analyses statistiques 166





3. Résultats : 167
4. Conclusion 175
10. Discussion 179
1. Altération du métabolisme énergétique dans le modèle souris SOD1(G93A)
2. Amélioration du métabolisme énergétique dans les souris
SOD1(G93A) entraînées à la nage 185
11. Conclusion 191
12. Perspectives





### Table d'illustration des figures

Figure 1 : Schéma représentatif des mutations observées chez les patients SLA (Laferière 2015) 33
Figure 2 : Représentation schématique des altérations cellulaires dans le modèle SOD1(G93A) de P7 à P75, Vinsant et al. 2013
Figure 3 : photographies représentatives des terminaison axonales et de leur plaque motrice (http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-musculaire-strie)
Figure 4 : Dessins représentatifs des caractéristiques d'un sarcomère
Figure 5 : Schéma représentatif des caractéristiques des unités motrices (Jami et al. 1982) 62
Figure 6 : Représentation des différentes cibles d'AMPK (Grahame et al. 2014)
Figure 7 : Représentation de l'identification de la séquence consensus et adressage au lysosome dans la CMA (Cuervo et al. 2014)
Figure 8: Analyse de l'état de phosphorylation d'AMPK dans le <i>tibialis</i> des souris SOD1(G93A) à P115 167
Figure 9 : Analyse des transcrits de <i>Tbc1d1</i> dans le <i>tibialis</i> des souris SOD1(G93A) à P115 168
Figure 10 : Analyse des transcrits de Chrebp dans le tibialis des souris SOD1(G93A) à P115 169
Figure 11 : Analyse des transcrits des enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse du cholestérol dans le <i>tibialis</i> des souris SOD1(G93A) à P115
Figure 12 : Analyse des transcrits de Pgc1a dans le <i>tibialis</i> des souris SOD1(G93A) à P115 172
Figure 13 : schéma représentatif de l'action de l'exercice physique sur PGC1a 173
Figure 14 : Analyse des transcrits de Fndc5 dans le <i>tibialis</i> des souris SOD1(G93A) à P115 173





#### Table d'illustration des tableaux

Tableau 1: Répertoire des gènes associés aux SLAf en septembre 2015	. 34
Tableau 2 : Echelle ALS-FR Cedarbaum 1999	. 40
Tableau 3 : Liste des ATG des levures et correspondances avec les gènes des mamiffères	. 80
Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour la quantification de protéine	164
Tableau 5 : Liste des couples de primers utilisés pour la RT-qPCR	166



#### Liste des abréviations





3-MA	3-Methyladenine
ABCA1	ATP-binding cassette 1
ACC1	Acetyl-CoA carboxylase 1
Ach	Acetylcholine
ADAR2	Adenosine Deaminase RNA-Specific 2
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acides gras
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
ALS-FRS	ALS Functional Rating Scale
AMP	Adénosine monophosphate
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPK	5' AMP-activated protein kinase
ANG	Angiogenin
APEX1	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase
APOE	Apolipoprotein E
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATF3	Activating transcription factor 3
ATG	Autophagy related gene
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
ATXN2	Ataxin 2
AVV	Adeno-associated virus
Bax	Bcl-2–associated X protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BclxL	B-cell lymphoma-extra large
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BDNF-TrkB	BDNF-Tropomyosin receptor kinase B
BSA	Bovine serum albumin

### C-D

c9 Fronto Temporal Desease
Chromosome 9 open reading frame 72,
Ion calcium
Cluster of differentiation 36
Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10
Charged multivesicular body protein 2b
Carbohydrate-responsive element-binding protein
Chaperone-mediated autophagy
Central nervous system
Ciliary neurotrophic factor
Coenzyme A
Coat protein complex I





COX CPT 2 CQ CS CYPD6 DAO DCA DCTN1 DGAT1	Cytochrome c oxidase Carnitine palmitoyltransferase (1 ou 2) Chloroquine Citrate synthase Cytochrome P450 2D6 D-Amino-Acid Oxidase Dichloroacetic acid Dynactin 1 Diglyceride acyltransferase 1
DGAT1	Diglyceride acyltransferase 1
DNA	Deoxyribonucleic acid

EAAT2	Excitatory amino-acid transporter 2
EAT	Epididymal adipose tissue
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ELP3	Elongator complex protein 3
ERBB4	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
FAS	Fatty acid synthase
FF	Fast fatigable
FIG4	FIG4 Phosphoinositide 5-Phosphatase
FNDC5	Fibronectin type III domain-containing protein 5
FR	Fast fatigue resistant
FUS	Fused in Sarcoma
G4C2	GGGGCC
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GluR2	Glutamate receptor subunits 2
GLUT4	Glucose transporter type 4

# H-L





### M-N

LMNB1	Lamin B1
MAO-B	Monoamine oxydase B
MATR3	Matrin-3
MCT-1	Monocarboxylate transporter 1
MN	Motoneurone
MNC	MN corticaux
MRF4	Myogenic regulatory factors 4
mTOR	mammalian target of rapamycin ou mechanistic target of rapamycin
MTORC1	mTOR complex 1
MUNE	Motor unit number estimation
MyF5	Myogenic factor 5
MyHC	Myosin heavy chain
Na⁺	Ion Sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NEFH	Neurofilament, Heavy Polypeptide
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-H	Neurofilaments heavy
NMDA	acide N-méthyl-D-aspartique
NO	Nitric oxide
NR2B	N-methyl-D-aspartate receptor subunit B
NSCs	Neural stem cells

O-P

O2 OH OPTN P62 PCR PDH PDK PDP PE PFA PFN1 PGC1α PH PI3K PIP3 PPAR PRKAA PRPH	Oxygène Anion hydroxyde Optineurin SQSTM1 Polymerase chain reaction Pyruvate deshydrogenase PDH kinase PDH phosphatases Phosphatidylethanolamine Paraformaldehyde PROFILIN 1 PPAR gamma coactivator 1-alpha potentiel Hydrogène Phosphoinositide 3-kinase Phosphoinositide 3-kinase Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate Peroxisome proliferator-activated receptor AMPK alpha 1 catalytic subunit Peripherin
PRPH	Peripherin
PVDF	PolyVinyliDene Fluoride





### Q-S

RAB Rach RE RNA ROS RPS26 RT SD SDS SETX SIGMAR SIA SLA SLA SLA SLA SLA SLA SLA SLA SLA SL	Ras superfamily of monomeric G proteins Récepteur à l'acetylcholine Reticulum endoplasmique Ribonucleic acid Reactive oxygen species Ribosomal Protein S26 Reverse transcriptase Slow Standard deviation Sodium dodecyl sulfate Senataxin Sigma-1 receptor Small interfering RNA Sclérose latérale amyotrophique SLA démence fronto temporale SLA familiale SLA familiale SLA sporadique Sclérose latérale primitive Spinal muscular atrophy Survival of motor neuron Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachmentprotein REceptor Small nuclear ribonucleoproteins Superoxide dismutase 1 Spastin
SPG4 SOSTM1	Pastic parapiegia-4 Sequestosome 1
SRERP	Sterol regulatory element-binding proteins
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

# T-Z

В
1













### 1. Introduction



### 1. Définition générale

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie humaine décrite pour la première fois en 1850 comme une pathologie exclusivement musculaire. Les atteintes nerveuses ne seront découvertes que trois ans plus tard par le médecin Jean Cruveilhier au cours d'une autopsie. Cependant, c'est en 1865 que le neurologue Jean Martin Charcot décrit précisément les atteintes nerveuses et musculaires. De même, il décrira un peu plus tard, en 1888, lors des « leçons du mardi à la Pitié Salpetrière » un cas de SLA bulbaire. Dès lors la SLA se divise en deux grandes classes, la SLA spinale et la SLA bulbaire. La SLA est caractérisée comme une maladie neurodégénérative progressive et fatale. Une faiblesse musculaire est rapidement observée et évolue vers une paralysie complète, induisant une insuffisance cardiorespiratoire, principale cause de décès. En 1941, en hommage à Lou Gehrig, un célèbre joueur de baseball décédé de la SLA, la maladie est désormais désignée sour le nom de « Lou Gehrig's disease » aux USA.

Cette maladie est peu connue du fait de sa faible prévalence. Cependant, il s'agit d'une des pathologies les plus dramatiques de notre siècle, car les capacités mnésiques et réactionnelles ne sont pas affectées et le diagnostic, souvent tardif, ne laisse que peu de temps au patient. Ainsi, la désillusion aussi bien du patient que de la famille est une réelle « douche froide » représentée l'an passé par le « ALS ICE BUCKET CHALLENGE ».

### 2. Manifestation clinique de la SLA

Les premiers symptômes apparaissent entre 55 et 65 ans, avec des atteintes de 20 à 80 ans (Hirtz et al., 2007). La durée de vie oscille de 3 à 5 ans (Mulder et al., 1986). Exception faite des SLA juvéniles qui présentent une apparition des symptômes avant 25 ans avec une durée relativement longue (Aggarwal and Shashiraj, 2006). Les formes juvéniles de SLA sont le plus souvent autosomales récessives, mais pas toujours, des formes dominantes ont été décrites (Ben Hamida





et al., 1990, Robin et al., 1999). Cette forme de SLA ne représente qu'une infime partie des patients et ne sera donc pas traitée dans la suite de cette thèse.

### 1. Les symptômes

La SLA se caractérise donc par une affection progressive du système nerveux central et périphérique au niveau des motoneurones corticaux (MNC) et des motoneurones spinaux (MN). Cette atteinte se traduit par une perte sélective des motoneurones. Les signes pathologiques observés sont des asthénies sévères, des crampes, une exagération des réflexes ostéo-tendineux (spasticité), une inversion du réflexe cutané plantaire (signe de BABINSKI) une hypertonie globale, des fasciculations (brèves secousses musculaires involontaires correspondant à l'activation isolée d'une unité motrice) et une atrophie progressive sans modification des informations sensorielles (Brooks, 1994; Brooks et al., 2000). Ces atteintes sont caractéristiques des premiers symptômes des SLA spinales.

Le syndrome pseudo-bulbaire se caractérise au départ par une atteinte bilatérale des voies pyramidales reliant les MNC à ceux du bulbe rachidien. Des atteintes bulbaires sont observées avec des difficultés de déglutition, de mastication et de phonation (dysarthrie) ainsi qu'une abolition du réflex vélo-palatin sont récurrentes et tendent à aggraver les difficultés respiratoires dues aux problèmes musculaires. Des troubles du faciès avec des accès spasmodiques de rires et de pleurs sans rapport avec l'état affectif caractérisent cette atteinte bulbaire. Pour l'une ou l'autre des formes observées, en fin de vie, le patient regroupera l'ensemble des symptômes.

La SLA spinale représente deux tiers des patients atteints de la SLA « classique » (Brooks, 1994; Brooks et al., 2000). Elle correspond aux premières descriptions faites par Chracot et Joffroy en 1869 avec une atteinte des membres inférieurs puis des membres supérieurs. Elle touche préférentiellement les hommes à l'inverse de la SLA bulbaire qui touche préférentiellement les femmes (Li et al., 1990). L'apparition de la SLA bulbaire est légèrement retardée (65 ans environ) mais la vitesse d'évolution est plus rapide (espérance de vie inférieure à 3 ans). D'autre part les symptômes apparaissent au niveau supérieur avec une première atteinte glosso-laryngée.



Pour compléter ce tableau clinique, on observe aussi une Sclérose Latérale primitive (SLP) représentant moins de 0,5% des cas de SLA. Dans cette forme moins sévère, la dégénérescence des motoneurones est exclusivement située dans le cortex induisant une faiblesse musculaire pouvant être invalidante. A la grande différence de la SLA, la SLP n'est pas considérée comme une maladie mortelle.

Communément, on n'observe pas de troubles cognitifs ni de démences dans les cas de SLA sauf dans 5% des cas. Ces cas particuliers sont regroupés comme des SLA associées à des démences fronto-temporales, qu'on retrouve sous le terme de SLA DFT. Ces deux classes de SLA, SLP et SLA-DFT, ne seront pas approfondies par la suite.

La SLA est une maladie incurable, il est donc nécessaire de poser le bon diagnostic et d'éliminer toutes les autres pathologies qui peuvent avoir des symptômes similaires.

Des risques de confusion sont possibles avec :

- les myosites à inclusion
- l'amyotrophie bulbaire ou spinale
- l'amyotrophie spinale progressive
- les intoxications chroniques au plomb
- la thyrotoxicose

PARIS DESCARTES

• les fasciculations bénignes.

Il s'agit d'une liste non exhaustive mettant en exergue la diversité de la SLA (Dubowitz, 2009; Grunseich et al., 2014).





### 2. Diversité de la SLA

### 1. Etiologie

On distingue deux classes de SLA, l'une est dite « sporadique », SLAs (qui se produit à intervalles irréguliers, qui se répartit de manière aléatoire) représentant la quasi-totalité des formes de SLA, et l'autre « familiale », SLAf, (qui est liée à des origines génétiques) ne représentant qu'une faible partie des cas de SLA. Les deux formes présentent les mêmes aspects cliniques. Cependant, l'âge d'apparition des symptômes est un peu plus précoce dans les SLAf, 46 ans à la place de 55 ans en moyenne, l'évolution est plus rapide (Camu et al., 1999; Hand and Rouleau, 2002) mais la répartition entre les sexes est homogène. Les SLAs sont quant à elles d'étiologie inconnue.

### 2. SLA sporadique

Les SLAs représentent environ 90% des patients atteints de SLA. Des facteurs de risques ont longtemps été considérés comme des facteurs déclencheurs de la maladie mais cela n'a pas pu être clairement établi. En outre, les incidences tendent à s'égaliser aux niveaux géographiques et socioprofessionnels, et pourraient être dues à l'amélioration du diagnostic, suite à la mise en place de critères d'évaluation. Actuellement, l'étiologie de la SLAs reste donc inconnue. Cependant, aux travers de ces nombreux cas indépendants de SLAs, des mutations gèniques ont été mises en évidence (Abel et al., 2012; DeJesus-Hernandez et al., 2011; Sreedharan et al., 2008; Vance et al., 2009), suggérant une prédétermination génétique propice au déclenchement de la pathologie dans certains contextes environnementaux ou socioprofessionnels.

#### Les mutations sporadiques

Sur les 90% des cas de SLAs, seuls quelques gènes ont été mis en évidence touchant plusieurs processus biologiques.

Environ 7% des cas de SLAs présentent une mutation du gène *SOD1* (super oxyde dismutase de type 1) qui permet la dismutation des radicaux oxygénés





Trois autres gènes ont été mis en évidence dans la SLAs, le gène *C9ORF72* (phase ouverte de lecture 72 sur le chromosome 9) (Bigio, 2011; DeJesus-Hernandez et al., 2011), *TARDBP* (TAR DNA-binding protein 43)(Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008) et *FUS* (fused in sarcoma). Ils sont, avec le gène *SOD1*, les quatre gènes les plus représentés dans les SLAf (Figure 1) (Laferriere and Polymenidou, 2015).



Figure 1 : Schéma représentatif des mutations observées chez les patients SLA (Laferière 2015)

. Ces mutations, présentes dans 70% des SLAf, seront plus approfondies dans le paragraphe suivant.

En plus de ces quatres principaux gènes, cerrtains gènes du métabolisme peuvent être mutés, par exemple le gène *CYPD6* (Siddons et al., 1996) et le gène *HFE* (Sutedja et al., 2007), intervenant respectivement dans le métabolisme des toxines exogènes et le métabolisme du fer.

Des gènes de protection de l'ADN tels que *APEX1* (apurinic/apyrimidic endonucléase1), *HOGG1* (8-oxoG DNA glycosylase) (Hayward et al., 1999), ainsi que la maturation de l'ARNm *ADAR2* (adenosine deaminase actind on RNA type2) (Hideyama et al., 2010), *SMN* (survival of motor neuron) (Corcia et al., 2009; Moulard et al., 1998; Veldink et al., 2005) ont été identifiés comme gènes cibles dans la SLAs.

Des mutations de gènes intervenant dans l'angiogenèse, *ANG* (angiogenin) et *VEGF* (vascular endothelium growth factor) (Lambrechts et al., 2003) ou dans la mise en place du cytosquelette *NF-H* (heavy neurofilament) (Al-Chalabi et al., 1999; Figlewicz et al., 1994a), et dans la dynamique des microtubules *SPG4* (spatine) (Meyer et al., 2005) sont autant de facteurs aggravant le développement de la pathologie.





### 3. SLA Familiale

Les SLA familiales ne représentent que 10% des SLA (Mulder et al., 1986), et la plupart des familles atteintes ne présentent que deux ou trois individus atteints, reliés entre eux au premier et second degré. Les SLAf se différencient en fonction du mode de transmission, dominant ou récessif, autosomal ou lié à l'X, et du gène muté. Seul 30% des cas familiaux présentent un grand nombre d'individus atteints (Valdmanis and Rouleau, 2008). Les études génétiques ont permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans la pathologie, (Gros-Louis et al., 2006; Laferriere and Polymenidou, 2015). Quatre gènes représentent les deux tiers des mutations actuellement mis en évidence dans la SLAf. Il s'agit de *SOD1* (20%), *TARDBP* (5%), *FUS* (5%), et *C9ORF72* (40%). De nombreux autres gènes ont été identifiés et sont répertoriés dans le tableau 1.

Tableau 1: Répertoire des gènes associés aux SLAf en septembre 2015





Classification	Gène	Localisation chromosomique	Déclaration des symptômes	Références
ALS 1	SOD1	21q22.11	adulte	Rosen et al. 1993
ALS 2	Alsine	2q33.2	adolescente	Hadano et al. 2001
ALS 3	ALS 3		adulte	Hand et al. 2002
ALS 4	SETX	9q32.13	adolescente	Chen et al. 2004
ALS 5	SPAST	2p24	adolescente	Meyer et al. 2005
ALS 6	FUS	16p11.2	adulte	Kwiatkowski et al. 2009
ALS 7	ALS 7	20p13	adulte	Sapp et al. 2003
ALS 8	VAPB	20q13.33	adulte	Nishimura et al. 2004
ALS 9	ANG	14q11.1	adulte	Greenway et al. 2006
ALS 10	TARDBP	1p36.22	adulte	Van Deerlin er al. 2008
ALS 11	FIG 4	6q21	adulte	Chow et al. 2009
ALS 12	OPTN	10p13		Maruyama et al. 2010
ALS 13	ATXN2	12q23-q24.1		Eden et al. 2010
ALS 14	VCP	9p13	adulte	Johnson et al. 2010
ALS 15	UBQLN2	Xp11.21	adulte	Deng et al. 2011
ALS 16	SIGMAR1	9p13	adolescente	Al-Saif et al. 2011
ALS 17	CHMP2B	3p12.1	adulte	Parkinson et al. 2006
ALS 18	PFN1	17p13.3		Wu et al. 2012
ALS 19	ERBB4	2q33.3-q34		Takahashi et al. 2013
ALS 20	HNRNPA1	12q13.1		Kim et al. 2013
ALS 21	MATR3	5q31.2	adulte	Johnson et al. 2014
ALS-FTD2	CHCHD10	22q11.23	adulte	Chaussenot et al. 2014
ALS-FTD1	C9orf72	9p21.2	adulte	Hosler et al. 2000
ALS	UNC13A	19p13.12		Chio et al. 2009
ALS	DAO	12q24	adulte	Millecamps et al. 2010
ALS	DCTN1	2p13	adulte	Puls et al. 2003
ALS	NEFH	22q12.1-q13.1	adulte	Meyer et al. 1995
ALS	PRPH	12q12		Gros-Louis et al. 2004
ALS	SQSTM1	5q35	adulte	Fecto et al. 2011
ALS	TAF15	17q11.1-q11.2	adulte	Ticozzi et al. 2011
ALS	SPAST	2p24		McDermott et al. 2003
ALS	ELP3	8p21.1		Simpson et al. 2008
ALS	LMNB1	5q23.2		Johnson et al. 2014

#### Tableau 1 : Répertoire des gènes associés aux SLAf en septembre 2015

tableau inspiré de la thèse de F. Schmitt, 2013 http://alsod.iop.kcl.ac.uk/




### SOD1 ou ALS1

SOD1, cuivre-zinc super oxyde dismutase1, est le premier gène identifié comme facteur de la SLA en 1991 (Siddique et al., 1991a). Il est localisé sur le chromosome 21 au niveau du locus q22. Une grande proportion de ces mutations se transmettent suivant le mode autosomique dominant, quoique des formes récessives aient été observées (Khoris et al., 2000; Siddique et al., 1991b; Vucic and Kiernan, 2009). Aujourd'hui plus de 150 mutations ont été décrites sur l'ensemble du gène (Tortelli et al., 2013), et il semblerait qu'une unique mutation suffise à changer la conformation de la protéine et à induire un gain de fonction toxique. Des variations cliniques sont observables suivant les mutations (Andersen, 2006). La SOD1, est une protéine de 153 acides aminés qui a un rôle antioxydant en permettant la dismutation des radicaux libres en dioxygène, peroxyde d'hydrogène et eau. Elle est présente dans le cytoplasme ou l'espace intermembranaire des mitochondries. Les mutations induisent une mauvaise conformation conférant un gain de fonction toxique ; elle est reconnue par le système ubiquitine, mais ne semble pas être dégradée (Kerman et al., 2010).

### TARDBP ou ALS10

Le gène *TARDBP* est localisé sur le chromosome 1, il code pour la protéine TDP-43 (transactive response DNA binding Protein of 43 kda), protéine de 414 acides aminés. TDP-43 est un régulateur transcriptionnel au niveau de domaine riche en polypyrimidine, il permet l'épissage alternatif. Ces deux fonctions lui confèrent un rôle dans de nombreux processus biologiques. D'autre part, il intervient au niveau des motoneurones spinaux en intervenant dans la régulation de la structure du cytosquelette (Strong et al., 2007).

Une trentaine de mutations connues pourraient intervenir dans la SLA et sont préférentiellement localisées dans l'exon 6. (Van Deerlin et al., 2008; Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Yokoseki et al., 2008). Ces mutations entraînent l'accumulation d'un fragment conduisant à une neurotoxicité, via des inclusions ubiquitinylées (Rutherford et al., 2008), associée à des défauts de transcription, d'épissage et de transports des ARN messagers.





#### FUS ou ALS6

*FUS*, aussi appelé *TLS* (translocated in liposarcoma), a été identifié dans environ 4% des SLAf (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). C'est une protéine de 526 acides aminés qui est principalement localisée au niveau nucléaire. On observe des mutations gains ou pertes de fonction, mais dans les deux cas on observe une altération de la signalisation intracellulaire et de possibles agrégats protéiques.

## C90RF72 ou ALS-FTD2

En 2011, une mutation a été identifiée au niveau du gène *C9ORF72*. Il s'agit d'une répétition excessive d'un hexanucléotide, GGGGCC (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Il est considéré comme la cause principale de SLA (40%) et de SLA DFT (25%) (Renton et al., 2011). Dans les individus sains, il y a au maximum 25 répétitions, alors qu'on peut dénombrer de 800 à 4400 répétitions chez les patients atteints de SLA (Gijselinck et al., 2012). La fonction biologique de C9ORF72 n'est pas encore bien établie. La protéine est principalement retrouvée dans différentes régions du cerveau et dans le cytoplasme des neurones et des terminaisons synaptiques. Les récentes études suggèrent un rôle important dans le trafic des endosomes ; sa colocalisation avec des protéines RAB dans les neurones implique C9ORF72 dans des processus d'endocytose et d'autophagie (Farg et al., 2014).

### 4. Les agrégats protéiques

Malgré la difficulté à diagnostiquer la SLA, la présence d'agrégats protéiques en post mortem, dans les motoneurones, est une caractéristique physiopathologique de la SLA. On distingue principalement deux types d'agrégats : les inclusions ubiquitinylées et les corps de Bunina (Xiao et al., 2006).

## Les inclusions ubiquitinylées

Dans les SLAf, suivant la mutation observée les agrégats des protéines mal conformées SOD1 (Kerman 2010), TDP-43 (Neumann et al., 2006) ou FUS (Mackenzie et al., 2011) sont retrouvées dans les inclusions ubiquitinylées.





Les inclusions observées dans les SLAf dépendent de la mutation observée. En effet les agrégats de protéine SOD1 ne sont retrouvés que chez les patients présentant la mutation SOD. D'autre part les agrégats de TDP-43 sont retrouvés chez l'ensemble des patients ne présentant pas la mutation SOD1 (Mackenzie et al., 2007).

### Les corps de Bumina

Les corps de Bumina sont des inclusions éosinophiles présentes dans 85% des cas de SLA. Ces inclusions sont observées chez les patients atteints de SLAs et dans les formes rapides de SLAf (Xiao et al., 2006).

## 3. Epidemiologie

La SLA est la plus fréquente des maladies du motoneurone adulte et se place à la troisième place des maladies neurodégénératives après la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. L'incidence annuelle présente des modulations suivant les zones géographiques et les activités quotidiennes. En moyenne, son incidence est comprise entre 1,5 et 2,7 pour 100 000 personnes, et une prévalence de 6 cas pour 100 000 personnes (Abhinav et al., 2007; Chio et al., 2009; Donaghy et al., 2010; Forbes et al., 2007; Johnston et al., 2006; Traynor et al., 1999). La prévalence reste très basse, due à la faible durée de vie des patients. Le ratio homme/femme est de 1,6 mais tend à s'équilibrer ces dernières années (Logroscino et al., 2010; Mitchell and Borasio, 2007; Worms, 2001; Zoccolella et al., 2008). Cependant, quelques foyers géographiques ne présentent pas ces mêmes rapports de proportions, par exemple l'ile de Guam, la péninsule de Kil, et la nouvelle Guinée occidentale pouvent présenter une incidence jusqu'à 100 fois plus élevée (Figlewicz et al., 1994b). L'environnement socio-professionnel peut aussi être un facteur d'influence sur le déclenchement de la pathologie. On observe une incidence augmentée pour certains corps de métier tels que les agriculteurs, les militaires et les sportifs de haut niveau (Kurtzke, 1982). Des expositions à des substances exogènes peuvent aussi aggraver les symptômes, tel que le tabac (Armon, 2009; Kamel et al., 1999), les pesticides, les métaux lourds... (Armon, 2003; Beghi et al., 2006; Gil et al., 2007; Sutedja et al., 2007, 2009). La modulation des facteurs psychologiques





peuvent se répercuter sur l'évolution des symptômes ; ainsi une étude a montré qu'une humeur maussade entraînait une accélération de la pathologie et une diminution de la durée de vie (Ganzini et al., 1999).

## 4. Diagnostic

Le diagnostic de la SLA est tardif, les patients viennent consulter à un stade avancé de la pathologie avec des faiblesses musculaires importantes. Il n'existe actuellement aucun biomarqueur moléculaire, ni de biomarqueur physique observable par des techniques neurophysiologiques ou d'imageries (Turner and Talbot, 2008). Il n'existe donc aucun test de détection de la SLA. Pour permettre le meilleur diagnostic possible la « World Federation and Neurology Committee on Neuromuscular diseases » (Brooks, 1994; Brooks et al., 2000) a établi des critères de diagnostic d'El Escorial (la ville du meeting). En 2000, les critères ont été affinés pour permettre de hiérarchiser la maladie, et sont présentés comme « critères révisés d'El Escorial ».

Ces critères se basent sur l'évolution des signes cliniques dont trois sont mis en exergue :

- une atteinte motoneuronale centrale
- une atteinte motoneuronale périphérique
- une aggravation des symptômes au cours du temps

Et sur l'absence de certaines atteintes :

- sensitives ou sensorielles
- sphinctériennes
- de la motricité oculaire
- du système nerveux autonome.

Actuellement, seul 10% des patients sont diagnostiqués dans les 6 mois suivant l'apparition des symptômes, et 18% des patients sont diagnostiqués 18 mois après les premiers symptômes. Or, la SLA est une maladie évolutive rapide, donc une prise en charge précoce est un atout pour la qualité de vie du patient.





Pour permettre le meilleur suivi du patient, de nombreuses échelles ont été mises en place. La première date de 1974, l'échelle de Norris (Norris 1974), elle est suivie, en 1987, de l'échelle de Appel (Appel et al., 1987), de l'ALSS (Hillel et al., 1989) et de l'ALS-FRS (Amyotrophic Lateral Sclerosis Functionnal Rating Scale) (tableau 2) (Cedarbaum et al., 1999). Cette dernière est, aujourd'hui, la plus utilisée et est complétée par un examen électromyographique permettant de mesurer le nombre d'unités motrices (MUNE : Motor Unit Number Estimation). L'ALS-FRS est un questionnaire basé sur la vie quotidienne et la possibilité de réalisation des tâches quotidiennes, elle se base sur la perception du patient vis-à-vis de sa maladie. Compléter cette analyse par la technique MUNE permet de suivre, au niveau physiologique, la perte progressive des fonctions musculaires.

Ainsi, le diagnostic de la SLA se fait tardivement, et seul des traitements symptomatiques peuvent être proposés.

Tableau 2 : Echelle ALS-FR Cedarbaum 1999





	Evaluation		Score patient	Performances
1	Parole	4 3 2 1 0		Normale Perturbations détéctables Intelligible avec répétition Utilisation occasionnelle d'une communication verbale Perte d'utilisation de la parole
2	Salivation	4 3 2 1 0		Normale Hypersialorrhée discrète avec bavage nocturne Hypersialorrhée modérée mais permanente Hypersialorrhée gênante Bavage continu nécéssitant l'utilisation de mouchoirs
3	Déglutition	4 3 2 1 0		Alimentation normale Quelques fausses routes Consistances modifiées des aliments Supplémentations alimentaires Alimentation parentérale exclusive
4	Ecriture	4 3 2 1 0		Normale Lente et imprécise mais compréhensible Tous les mots ne sont pas compréhensibles Tenue du stylo avec incapacité d'écriture Incapable de tenir un stylo
5	Hygiène	4 3 1 0		Normale Autonome mais avec une efficacité diminuée Assistance occasionnelle ou substitution Assistance d'une tierce personne requise Assistance permante et totale
6	Préparation des aliments	4 3 2 1 0		Normale Lente et maladroite mais seul Aide occasionnelle pour couper les aliments Les aliments sont préparés mais mange seul Doit être nourri
6	En cas de gastronomie	4 3 2 1 0		Utilisation normale et autonome Maladroit mais toutes les manipulations sont effectuées seul Aide nécessaire pour la mise en place Fournit une aide minime aux soignants Doit être nourri
7	Mobilisation au lit	4 3 2 1 0		Normale Lenteur et maladresse mais autonome Ajuste les draps avec difficulté Peut bouger mais pas se retourner dans le lit Dépendant





8	Marche	4 3 2 1 0		Normale Difficultés de déambulation Marche avec assistance Mouvements sans déambulation Pas de mouvement des jambes		
9	Montée des escaliers	4 3 2 1 0		Normale Lente Est fatigué Aide nécessaire Impossible		
10	Dyspnée	4 3 2 1 0		Absente A la marche Dans une ou plus des situations suivantes : Repas/Toilette/Habillage Au repos, difficultés respiratoires en position allongée ou assise Difficultés importantes, envisage l'utilisation d'un appareil de ventilation mécanique		
11	Orthopnée	4 3 2 1 0		Absente Quelques difficultés pour dormir la nuit (souffle court), utilise que deux oreillers Besoin de plus de deux oreillers pour dormir Ne peut dormir qu'assis Ne peut pas dormir		
12	Insuffisance respiratoire	4 3 2 1 0		Absente Utlisation intermittente d'une assistance ventilatoire Utlisation continue d'une ventilation non invasive la nuit Utlisation continue d'une ventilation non invasive de jour comme de nuit Ventilation mécanique invasive par intubation ou trachéotomie		
	Total		/48			
	Dyspnée : difficulté respiratoire Orthopnée : difficulté respiratoire allongée					





## 3. Traitements en cours d'étude

Malgré ces centaines d'années qui nous séparent de la première description de la SLA, il n'existe pas de traitement curatif connu. Une seule molécule a réussi à être homologuée en tant que traitement ; il s'agit du Rilutek© (riluzole) (Foran and Trotti, 2009). Le riluzole permet de réguler le glutamate, neurotransmetteur excitateur, en activant la recapture au niveau post synaptique et en inhibant les canaux voltages dépendants (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>). Or dans la SLA, une augmentation du glutamate extracellulaire, une diminution des processus de recapture du glutamate par les astrocytes, une baisse des niveaux d'expression du transporteur au glutamate EAAT2 (excitatory amino-acid transporter 2) et une altération de la gutamine synthétase ont été observées (Andreadou et al., 2008; Ferrarese et al., 2001; Plaitakis and Constantakakis, 1993). De plus, le glutamate, à trop forte concentration, est excitotoxique pour les motoneurones (Van Den Bosch and Robberecht, 2000; Vandenberghe et al., 2000). Ainsi le riluzole a un effet neuroprotecteur dans la SLA en diminuant le niveau de glutamate extracellulaire (Bensimon et al., 1994). Cela permet une augmentation de la durée de vie d'environ trois mois, mais ne change pas la vitesse d'apparition des symptômes. Aucune amélioration musculaire n'est observée à la suite de ce traitement.

De nombreuses études sur modèles animaux sont prometteuses, et une multitude de cibles est analysée. Un grand nombre d'études en phase clinique sont en cours, on observe comme cible possible : les mitochondries, les cellules lymphocytaires T, la modulation de macrophages et de l'autophagie, les mastocytes, les cellules gliales, les motoneurones, la jonction neuromusculaire et bien sûr le muscle. Ainsi, l'ensemble des études couvre deux aspects importants de la pathologie, l'atteinte nerveuse et l'atteinte musculaire, aussi bien au niveau métabolique que cellulaire (Bucchia et al., 2015).

## 1. Protection mitochondriale : Dexpramipexole et rasagiline (ethiopathogenesis)

L'importance de l'énergie pour les motoneurones est primordiale ; un défaut mitochondrial induit une baisse importante en énergie, et peut entraîner la mort des motoneurones (Wong et al., 1995). Deux drogues ont été proposées pour réduire le



stress oxydant afin de protéger les motoneurones : le dexpramipexole, et la rasagiline.

PARIS DESCARTES

Le dexpramipexole est une drogue augmentant les fonctions mitochondriales (Gribkoff and Bozik, 2008). Les études précliniques montrent une diminution de la mort neuronale après un traitement au dexpramipexole, cela induit une augmentation de la production d'ATP, une diminution de la consommation en oxygène, et une stabilisation du profil métabolique. De plus, des effets bénéfiques ont été montrés sur la toxicité de l'inhibition du protéasome (Alavian et al., 2012; Cheah and Kiernan, 2010). Cette drogue est couramment utilisée pour le traitement de la maladie de Parkinson (Brusa et al., 2003; Frampton, 2014; Möller and Oertel, 2000). Dans la SLA, après une bonne tolérance, par un petit groupe de patient, le dexpramipexole est passée en phase II. Les premières études montrent une diminution de la vitesse d'apparition des symptômes, permettant ainsi le démarrage de la phase III. Cependant, à plus grande échelle cela semble être un échec. Les effets prometteurs de la phase II semblent être dus à une faible cohorte ayant bien réagie (Cudkowicz et al., 2013).

La Rasagiline (N-propargyl-1-R-aminoindan) est une drogue inhibant la monoamine oxydase B (MAO-B), là aussi déjà utilisée dans la maladie de Parkinson. Elle peut potentiellement améliorer les motoneurones en augmentant la survie et la perméabilité mitochondriale (Weinreb et al., 2010). Après des résultats probants, la molécule se trouve actuellement en phase II. Les patients SLA présentent une bonne tolérance au traitement, et des modifications mitochondriales sont observables (Macchi et al., 2015).

### 2. Stimulation de l'autophagie

Le lithium carbonate est un composé inorganique, développé pour le traitement des troubles bipolaires et souvent prescrit lors de cas de dépression. Il agit comme un anti-apoptotique et diminue l'activité glutamatergique (Fornai et al., 2008). Dans le cadre de la SLA, il stimulerait l'autophagie des protéines agrégées. Le traitement au lithium se trouve actuellement en phase III en double aveugle, sur un traitement de 18 mois. Les résultats de cette étude ne montrent pas de différences intéressantes entre le groupe placebo et le groupe traité ; les résultats de certaines





équipes suggèrent même un effet délétère du traitement (Aggarwal et al., 2010; Chiò et al., 2010; Miller et al., 2011; Verstraete et al., 2012; Wicks et al., 2011).

## 3. Anti SOD1

Un anticorps SOD1 a été injecté aux patients. Les premiers résultats suggèrent un ralentissement des symptômes et une diminution des agrégats de SOD1 mutée dans les neurones (Van Blitterswijk et al., 2011). Une autre approche est l'utilisation de Neurimmune, NI-204, un anticorps monoclonal humain qui ciblerait la protéine SOD1 mutée permettant de réduire la neurodégénérescence. Enfin une troisième approche est l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens nommé ISI-SOD1RX (Smith et al., 2006). Cette molécule, injectée en intrathécale, induit une diminution du niveau de SOD1 dans le liquide cérébelleux ; les patients semblent tolérants au traitement (Miller et al., 2013).

De récentes études sont réalisées en ciblant C9ORF72 (Donnelly et al., 2013; Lagier-Tourenne et al., 2013; Sareen et al., 2013; Zu et al., 2013). Cet antisens devrait aboutir à une phase clinique chez l'homme (Donnelly et al., 2013).

### 4. Traitement avec des cellules souches neurales (NSCs)

L'implantation de cellules souches neurales, notamment d'astrocytes sains, permettent un nouveau support aux neurones diminuant ainsi leur dégénérescence. Cette introduction de cellules gliales a pour but d'améliorer l'environnement des neurones en réduisant l'inflammation et limiter les agrégats protéiques. Les études de transplantation de NSCs rapportent une amélioration importante des symptômes dans 25% des cas (Teng et al., 2012). Pour les injections humaines, les NSCs proviennent des cellules souches de fœtus et sont injectées en intrathécal entre les vertèbres C3 et C5 pour la protection des motoneurones nécessaires à la respiration (Riley et al., 2012). A l'issue de la phase I, le traitement est correctement toléré et les seuils de douleurs ne semblent pas être augmentés. Cette procédure devrait donc entrer en phase II (Riley et al., 2012).





## 5. Modulation de la jonction neuromusculaire

L'Ozanezumab (GSK1223249) est un anticorps ciblant la protéine NogoA, protéine qui inhibe la pousse des neurites. Elle se trouve en excès dans les muscles de patients SLA (Gordon, 2013). L'Ozanezumab permet de réparer les dommages observés sur les terminaisons axonales des motoneurones et de reconnecter ces axones aux muscles (Meininger et al., 2014). Cette molécule est actuellement en phase II sur un traitement de 48 semaines.

## 6. Stimulation musculaire par Tirasemtiv

Le Tirasemtiv (CK-357) est une troponine qui permet de moduler la contraction des muscles squelettiques rapides en augmentant la sensibilité au calcium (Russell et al., 2012). La modulation directe de la contraction musculaire représente une stratégie thérapeutique mimant en partie un exercice physique. La molécule étant bien tolérée par les patients, un recrutement de 400 individus vient d'être réalisé pour commencer la phase IIb (Shefner et al., 2013).





## 2. Les modèles animaux

Il est maintenant admis que la SLA est une maladie multifactorielle, cependant, durant des décennies, la SLA était considérée comme une maladie neurodégénérative, avec, pour seules analyses possibles, les autopsies. De ce fait les seules données que l'on pouvait avoir, étaient exclusivement des données de stade terminal de la maladie, avec des atrophies musculaires sévères et des atteintes neuronales marquées. En 1993, Rosen publie ses données sur la découverte de la mutation SOD1, avec une forte proportion de cette mutation dans les SLAf (Rosen et al., 1993). Un an plus tard, en 1994, Gurney et ses collaborateurs publient le premier modèle animal permettant d'étudier la SLA (Gurney et al., 1994). En une vingtaine d'années, de nombreux modèles animaux ont été développés pour permettre des études plus précises et localisées et, ainsi répondre aux nombreuses questions scientifiques. Aujourd'hui les recherches sur la SLA peuvent se faire aussi bien sur des modèles murins (mus musculus), que sur des modèles de drosophile (drosophila melanogaster), de nématode (caenorhabditis elegans), de poisson zèbre (danio rerio), et de rat (rattus norvegicus). Cette pluralité de modèle est un atout majeur pour comprendre plus spécifiquement le rôle que jouent les gènes mutés observés chez les patients.

## 1. Modèle murin

## 1. Modèle SOD1(G93A)

En 1994, un premier modèle murin de la SLA a été créé (Gurney et al., 1994) par surexpression de la protéine SOD1 humaine mutée en position 93 (remplacement d'une Glycine par une Alanine en position 93). Le nombre de copies du transgène est corrélé au phénotype clinique, et module l'apparition des symptômes, la sévérité de la pathologie, et la durée de vie des animaux (Dal Canto and Gurney, 1995, 1997). On différencie deux modèles avec la même mutation, le modèle « high copy » avec un nombre de copies du transgène supérieur à 30, et un second modèle « low copy » avec un nombre de copies inférieur à 5. C'est actuellement le modèle murin le plus utilisé, mais il présente certaines limites,





comme une absence d'atteinte significative des motoneurones corticaux. Le transgène est lié au promoteur humain, et la protéine SOD1 murine est toujours fonctionnelle. L'agrégation de protéine SOD1 mal conformées est retrouvée dans la majorité des tissus de ce modèle (Watanabe et al., 2001). Il représente un bon modèle d'étude de la SLA car il présente une forme typique et progressive de SLA spinale, avec une atteinte asymétrique des membres postérieurs et une progression de la paralysie jusqu'à l'arrêt cardiorespiratoire. Les symptômes apparaissent vers 90 jours post natal (début de la phase symptomatique), avec un déficit du réflexe d'extension. Une aggravation est observable par atonie de la queue qui induit une modification de mouvement. Une paralysie s'installe peu à peu. Vers 120 jours, les souris présentent une paralysie bilatérale et quelques jours plus tard une incapacité de se relever si elles sont installées sur le flanc. Au niveau dorsal, une scoliose est observable, conséquence de la faiblesse musculaire. Elles ont une durée de vie de 130 jours environ.

Ce modèle, préférentiellement étudié au cours de ces dernières années, montre des atteintes moléculaires et cellulaires dès l'âge embryonnaire.



Figure 2 : Représentation schématique des altérations cellulaires dans le modèle SOD1(G93A) de<sup>1</sup>8 P7 à P75, Vinsant et al. 2013



Au niveau musculaire, la dénervation commence aux alentours de 25 jours post natal (P25) (Figure 2) dans un des muscles les plus touchés « le *tibialis* », et continue au fur et à mesure de la progression de la pathologie (Vinsant et al., 2013a, 2013b). Cependant, les motoneurones ne dégénèrent qu'à partir de P44, et à P75 le nombre d'interneurones est modifié (Martin and Chang, 2012). Le laps de temps observé entre la dénervation et la perte des motoneurones permet le maintien de l'axone, et la diffusion de protéines au niveau musculaire peut permettre une réinnervation (Miledi and Slater, 1968). Dans le cas de la SLA, la réinnervation ne se maintient pas et la dénervation va induire une fragmentation des plaques motrices, qui seront alors moins fonctionnelles.

PARIS DESCARTES

Vers P60, le transport axonal ne semble pas être perturbé malgré l'atteinte de la jonction neuromusculaire. Au niveau de la synapse et des motoneurones, une diminution du nombre de mitochondries et une vacuolisation de ces dernières sont observées. Malgré la dénervation à P25, les capacités motrices dans des conditions normales ne sont pas affectées (Vinsant et al., 2013a). Cependant, avec l'utilisation d'un tapis incliné, une différence est observable entre les souris contrôles et les souris SLA. Au niveau de la force la conclusion est identique, une absence de différence significative est observée sur un test utilisant un poids de 20g, alors que les souris SLA présentet une diminution des capacités musculaires sur un poids de 40g (Vinsant et al., 2013a). A P90, dans les motoneurones, une fragmentation de l'appareil de golgi (Mourelatos et al., 1996), une agrégation de protéine SOD1 mutée au niveau des neurofilaments (Bruijn et al., 1998) ont été mis en évidence. Dès P100, il y a disparition des somas des motoneurones des colonnes motrices (Fischer et al., 2004).

## 2. Autres modèles murins SLA

Il existe aujourd'hui une quinzaine d'autres modèles murins mutés pour SOD1 (Shibata, 2001; Turner and Talbot, 2008). Chaque modèle présente des avantages et des inconvénients. A titre d'exemple, le modèle murin SOD1(G86R) (Ripps et al., 1995), représentatif de la mutation humaine SOD1G85R, a la particularité d'avoir la mutation au sein du gène murin *Sod1*. Sa transcription est donc dépendante de la régulation du gène *Sod1* murin, et la forme sauvage de la protéine n'est donc pas





exprimée. D'autre part, l'agrégation de la protéine SOD1 n'est pas présente dans ce modèle, à l'image de la pathologie humaine (Bergemalm et al., 2006).

#### 1. Modèle TDP-43

Deux autres modèles souris ont été développés. Le premier, avec une surexpression du gène humain *TARDP* sous le contrôle d'un gène murin, *Thy1*, exprimé exclusivement dans les motoneurones. Pour permettre une expression du transgène élevée, plusieurs transgènes ont été inclus, et le modèle souris est homozygote pour le gène concerné (Wils et al., 2010). Le second possède aussi un transgène humain possédant la mutation A315T et est sous contrôle du gène murin *Prnp* (prion protein promoter) (Wegorzewska et al., 2009) Ces souris présentent une dégénérescence des motoneurones et des neurones moteurs corticaux. Elles ont une durée de vie entre 5 à 8 mois, et la sévérité semble corrélée au nombre de copies du transgène. De plus, ces deux modèles souris présentent des inclusions ubiquitinylées au niveau des neurones, caractéristique présente chez une majorité de patients.

### 2. Modèle FUS-R521C

Le modèle souris FUS (Fused in sarcoma) est réalisé par expression du « FLAG-tagged-FUS R521C » sous contrôle du gène *Prp* de hamster (Qiu et al., 2014). Il présente des altérations de l'ADN (augmentation de γH2AX, marqueur caractéristique des doubles brins et de l'instabilité du génome), une augmentation de la stabilité des complexes protéines/protéines et protéine/ARN et un défaut de l'épissage des ARN, dans les neurones corticaux et les motoneurones spinaux. Ces altérations induisent un défaut des processus de transcription et de traduction des gènes intervenant dans la mise en place des synapses et la pousse dendritique, ainsi qu'une dérégulation de la voie de signalisation BDNF-TrkB (Brain-Derived Neurotrophic Factor-Tyrosine receptor kinase B). Ces souris sont caractérisées par une durée de vie de 3 à 6 mois, avec une durée des symptômes de 4 à 6 semaines. On observe une réduction de la masse musculaire, des problèmes de coordination motrice, une paraplégie spasmodique et des atteintes nerveuses.





## 3. Modèle c9FTD/ALS

Le modèle c9FTD mime la sous partie de la SLA avec des atteintes frontotemporales. Pour créer ce modèle, une équipe a réalisé une injection intracrânienne d'un vecteur AVV (Adeno-associated Viral) contenant l'hexanucléotide GGGGCC (G4C2) (Chew et al., 2015). Cette injection à P0 permet la surexpression, de 2 à 66 fois de G4C2, mimant ainsi la surexpression de l'héxanucléotide chez les patients SLA. Les souris développent un comportement anormal (hyperactivité, anxiété, comportement asocial), une perte de poids, des faiblesses musculaires et des inclusions ubiquitinylées de TP-43 phosphorylé.

## 3. Autres modèles animaux

## La drosophile

Un modèle de drosophile a été créé en intégrant la mutation SOD1 humaine (Watson et al., 2008). Les mouches présentent des difficultés motrices, une altération dans la transmission synaptique et une accumulation de la protéine hSOD1 dans les motoneurones ainsi qu'une augmentation des protéines de choc thermique (HSP) dans les cellules gliales.

## Le poisson Zèbre

Un modèle de poisson zèbre a été créé avec une mutation SOD1G93R (Ramesh et al., 2010). Les animaux portant la mutation présentent, durant la phase asymptomatique, une force musculaire normale mais une diminution de l'endurance. Dans les stades symptomatiques, une perte des motoneurones est observée ainsi qu'une atrophie musculaire, une paralysie partielle et une mort prématurée.





## Caenorhabditis elegans (C.elegans)

Le nématode est un vers de quelques millimètres dont le génome a été entièrement séquencé (C. elegans Sequencing Consortium, 1998). De nombreux gènes impactés dans la SLA ont un orthologue dans le génome de C.elegans (Therrien and Parker, 2014). La facilité de modification du génome a donc permis la création de modèle d'étude de la SLA par modulation des gènes connus : SOD1, TARDBP, FUS, C9ORF72 (Murakami et al., 2012; Oeda et al., 2001; Therrien et al., 2013; Zhang et al., 2012). Le nématode, quoique peu utilisé actuellement, reste un modèle intéressant pour le développement des connaissances.





# 3. Physiopathologie de la SLA

## 1. Complexité de la physiopathologie de la SLA

La SLA est une maladie complexe qui, comme on a pu le voir jusqu'à maintenant met en jeu de nombreux mécanismes cellulaires. L'ensemble de ces altérations conduisent à une détérioration musculaire et à la mort sélective des motoneurones. La majorité des mécanismes altérés sont interconnectés : l'agrégation protéique de SOD1 ou de TDP-43, l'augmentation des radicaux libres, le dysfonctionnement mitochondrial, l'excitotoxicité glutamatergique, l'altération de l'apoptose, de l'autophagie et du métabolisme énergétique.

## 2. Les altérations dues à la protéine SOD1

En 1993, Rosen et collaborateurs mettent en évidence la mutation SOD1 chez les patients atteints de SLAf. L'observation d'une diminution d'activité dans les globules rouges induit l'idée d'une perte de fonction de la protéine SOD1 et donc, une augmentation des radicaux libres dans les cellules (Deng et al., 1993). Cependant en 1994, Gurney et collaborateurs créent une souris avec le transgène humain muté ; la protéine SOD1 endogène est toujours fonctionnelle, mais les souris développent une SLA. En 1996, Reaume et collaborateurs crée une souris invalidée pour le gène SOD1 qui ne développe pas de SLA (Reaume et al., 1996). L'hypothèse d'un gain de fonction toxique de la protéine est donc plus plausible. La mutation induit un changement conformationnel (Kerman et al., 2010; Rakhit et al., 2004) qui modifie l'activité enzymatique et augmente sa capacité d'agrégation (Stathopulos et al., 2003).

La protéine SOD1 a un rôle très important dans la diminution des radicaux libres. Le stress oxydant, déséquilibre entre les molécules oxydantes et les antioxydantes, est donc augmenté dans le cas de la SLA. Les principaux radicaux libres, classés dans les espèces réactives à l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) sont les radicaux superoxydes (O2-•), le monoxyde d'azote (•NO), et les





radicaux hydroxyles (•-OH). Ces ROS sont produits par la chaîne respiratoire mitochondriale lors du passage des électrons dans les complexes I et III. Ces espèces réactives, étant très instables, peuvent créer des dommages à la cellule via des mécanismes d'oxydation non contrôlés.

La mutation de la protéine SOD1 induirait une activité pro-oxydante (Cleveland and Liu, 2000) ainsi qu'une activité peroxydase, induisant ainsi des dommages à l'ADN (Wiedau-Pazos et al., 1996). Suivant la mutation de la protéine SOD1, on peut observer une action inverse de sa fonction basale, avec une production d'anion superoxyde (Estévez et al., 1999) ou une perte de la charge en zinc, ce qui augmente la concentration de zinc cytoplasmique, favorise le stress oxydant et la dégénérescence des motoneurones (Hall et al. 1998; Kraft et al. 2007).

## 1. Agrégats toxiques et protéine SOD1

Les protéines SOD1 mutées induisent des augmentations du stress oxydant aussi bien dans la moelle épinière que dans les muscles (Hall et al., 1998; Kraft et al., 2007). Une accumulation des protéines SOD1 mutées forment des agrégats insolubles, constitue un des marqueurs histopathologiques caractéristiques de la SLA chez les patients (Ince et al., 1996; Kato et al., 1996) comme chez les souris (Bruijn et al., 1998; Johnson, 2000). Ces agrégats sont principalement localisés dans les motoneurones, les cellules musculaires et les astrocytes ; leur concentration influe directement sur la sévérité de la pathologie (Turner et al., 2003).

Ces agrégats se lient à des protéines essentielles de la cellule, telles que les protéines SMN, les protéines gémines et les SnRNPs (small nuclear ribonucloprotein particles) (Blokhuis et al., 2013), empêchant ainsi leur bon fonctionnement. L'activité restreinte de ces protéines perturbe fortement les fonctions cellulaires (Turner et al. 2008).

La présence des agrégats et la perturbation des fonctions cellulaires entraînent une modulation du profil d'expression génique dans les motoneurones et les muscles via le métabolisme des ARNm.





## 2. Modulation de l'édition des ARN

Les protéines SOD1 mutées s'agrègent au niveau des protéines TDP-43 (Neumann et al., 2006) et de SMN (Turner et al., 2009), deux protéines impliquées dans la maturation des ARNm.

Dans de nombreux cas de SLA, des mutations sont présentes au niveau de la protéine TDP-43 (Van Deerlin et al., 2008; Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Yokoseki et al., 2008), dans d'autre cas TDP-43 est seulement surexprimée, anormalement phosphorylée et ubiquitinylée (Cheah and Kiernan, 2010). Le fonctionnement de cette protéine dans la transcription, l'épissage et la maturation des ARN est donc altérée. Cependant l'accumulation de TDP-43 n'est pas un marqueur histopathologique de la SLA, mais l'indication d'un processus neurodégénératif avec activation de l'autophagie (Wang et al., 2010).

La protéine SMN intervient dans la mise en place du spilceosome (complexe de maturation de l'ARN) et facilite la formation du complexe des SnRNPs (Fischer et al., 1997). Kunst et collaborateurs montrent un lien direct entre le niveau de la protéine SMN et la sévérité de la pathologie (Kunst et al., 2000; Turner et al., 2009).

## 3. Modulation de la conformation des protéines

Les protéines SOD1 mutées interagissent aussi avec de nombreuses protéines chaperonnes qui interviennent dans la maturation et le repliement des protéines (Bergemalm et al., 2010). Dans la SLA une surexpression de ces protéines a été observée (Veldink et al., 2005; Wang et al., 2009) et les protéines mal conformées tendent à s'accumuler dans le cytoplasme induisant ainsi une augmentation de système ubiquitine/protéasome et de l'autophagie (Leigh et al., 1991; Muller et al., 2007).





## 4. Perturbation du fonctionnement des organites

L'augmentation des agrégats cellulaires induit des changements dans l'organisation intrinsèque des cellules. Les organites cellulaires tels que le réticulum endoplasmique (RE) ou les mitochondries n'échappent pas à ces désorganisations.

Un stress du RE a été mis en évidence aussi bien chez les souris que chez les patients SLA (Atkin et al., 2006; Ito et al., 2009; Kikuchi et al., 2006; Sasaki, 2010; Saxena et al., 2009). L'encombrement des protéines mal conformées au sein du RE a pour conséquence l'activation de la voie UPR (unfolded protein response) induisant une diminution globale de l'ensemble de la synthèse protéique (Foufelle and Ferré, 2007). Face à l'importance de protéines mal conformées, la réponse UPR n'est plus suffisante et la voie apoptotique est engagée (Saxena et al., 2009).

Un second organite intervient dans l'activation de la voie apoptotique : les mitochondries. L'altération mitochondriale est une caractéristique de la SLA. Une augmentation du nombre et une diminution des fonctions ont été mises en évidence chez les patients SLA (Afifi et al., 1966; Wiedemann et al., 2002). Dans les modèles souris, les altérations mitochondriales sont dépendantes du modèle souris utilisé. Ainsi, pour le modèle SOD1(G93A), une vacuolisation des mitochondries est observée dans la moelle épinière et dans les muscles (Dal Canto and Gurney, 1995; Leclerc et al., 2001). Cette vacuolisation est due au défaut de localisation de la SOD1 mutée, qui, au lieu d'être au niveau cytoplasmique, se retrouve au niveau mitochondrial. L'activité mitochondriale est fortement diminuée, notamment au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire (Browne et al., 1998). Les agrégats protéiques altèrent les capacités membranaires de la mitochondrie et diminuent le passage de l'ADP dans l'espace intermembranaire, avant pour conséquence future une diminution de la production d'ATP (Mattiazzi et al., 2002). La toxicité des agrégats induit localement une production de ROS, ainsi qu'une altération du potentiel de membrane permettant l'augmentation de la perméabilité, l'entrée de molécules d'eau dans la mitochondrie (De Vos et al., 2007) et la sortie de cytochrome c (Higgins et al., 2003). Ceci déclenche l'activation des caspases et l'apoptose (Mignotte and Vayssiere, 1998).





# 5. Modulation calcique et excitotoxicité glutamatergique

L'activation des récepteurs au glutamate induit l'entrée d'ions calciques et sodiques, permettant ainsi la formation du potentiel de membrane. Dans les motoneurones des souris SLA, l'ion calcium (Ca<sup>2+</sup>) se trouve en excès dû : d'une part aux défauts mitochondriaux et à l'excitotoxicité glutamatergique et d'autre part à la diminution de l'expression de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) (Van Damme et al., 2002, 2007). Cet afflux de Ca<sup>2+</sup> entraîne l'activation de nombreuses enzymes dégradant le cytosquelette, les membranes cellulaires et les composés moléculaires. L'ensemble des altérations se situe avant l'apparition des symptômes et pourrait être en partie responsable de l'activation de la voie apoptotique et de la mort spécifique des motoneurones (Choi et al., 2009). La surexpression de la protéine GluR2 dans un modèle souris permet un retard d'apparition des symptômes et une augmentation de la durée de vie de souris (Tateno et al., 2004).

## 6. Autres voies conduisant à l'apoptose

Les protéines anti-apoptotiques telles que BCL2 ou BCLXL, se retrouvent emprisonnées dans les agrégats formés par les protéines mal conformées (Pasinelli et al., 2004), leur action est ainsi diminuée. En parallèle ce sont les facteurs pro apoptotiques tels que Bax, Bad, Bcl-xS, qui voient leur expression augmentée (Vukosavic et al., 1999). Une augmentation du nombre de récepteur au TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) est observable à la membrane des motoneurones (Veglianese et al., 2006) induisant ainsi l'activation des caspases (Guégan et al., 2001). La voie Fas/FasL, activée dans la SLA, participe aussi à la mise en place de l'apoptose (Pettmann et al., 2006).





## 4. Origine cellulaire de la SLA.

Pendant longtemps considérée comme une maladie musculaire, les premières autopsies révèlent les atteintes nerveuses. De ces observations découlent l'hypothèse qui prévaudra pendant plusieurs années : la SLA est une maladie des motoneurones. Pour permettre d'explorer cette hypothèse, un modèle murin, exprimant la SOD1 mutée exclusivement dans les motoneurones a été créé (Pramatarova et al., 2001). Ce modèle ne développe pas de SLA ni de signes cliniques d'atteinte du motoneurone (Lino et al., 2002). A contrario, l'exclusion de la SOD1 mutée dans le motoneurone permet de retarder l'apparition des symptômes mais pas la progression de la pathologie (Boillée et al., 2006). Afin d'évaluer l'importance des cellules nerveuses autres que les motoneurones, deux types de souris ont été étudiés en parallèle : un modèle avec l'expression de la SOD1 mutée dans le motoneurone (cellules gliales saines) et un modèle avec l'expression de la SOD1 mutée dans les cellules gliales (motoneurone sain). Dans la première condition, les motoneurones survivent alors que dans la seconde, les motoneurones développent des marqueurs histopathologiques de SLA (Clement et al., 2003; Pettmann et al., 2006). Ces souris chimères mettent en évidence la complexité de la SLA et des interactions cellulaires. Il est donc admis que la SLA n'est plus exclusivement une maladie du motoneurone, mais bien une maladie non autonome, avec une atteinte de l'unité motrice dans son ensemble, des cellules gliales mais aussi des neurones corticaux.

## 1. L'unité motrice

On définit l'unité motrice comme la plus petite unité contractile. Elle correspond à un motoneurone innervant plusieurs fibres musculaires. Elle peut être divisée en trois sous parties : la moelle épinière et plus précisément le motoneurone  $\alpha$ , la jonction neuromusculaire (JNM) et le muscle. Au cours du développement, le motoneurone et le muscle sont indépendants l'un de l'autre. A partir de la formation de la JNM, il existe une corrélation directe entre les propriétés électriques du motoneurone, les propriétés mécaniques des fibres musculaires et de la force



contractile (Burke RE, 1994; Henneman, 1991). L'unité motrice est donc une entité nécessaire et suffisante à la contraction musculaire.

Les motoneurones sont localisés dans la moelle épinière qui elle-même est divisée en plusieurs sous-parties : cervicales (C1 à C8), thoraciques (T1 à T12), lombaires (L1 à L5), sacrées (S1 à S5) et coccygien (C0). Chaque zone va innerver les parties du corps de manière cervico/sacrale.

Les motoneurones se localisent dans la corne ventrale de la moelle épinière, de part et d'autre du canal de l'épendyme. Ce sont des cellules nerveuses multipolaires, elles ne possèdent qu'un seul axone mais de nombreuses dendrites, permettant la communication avec les cellules avoisinantes. Les axones moteurs quittent la moelle épinière au niveau des racines ventrales, et vont se ramifier pour se connecter aux différentes fibres musculaires via la jonction neuromusculaire (JNM).

En pré-synaptique, la JNM est caractérisée par un élargissement de l'axone et la présence de cellules de Schwann terminales non myélinisantes. Cette structure permet le passage de l'information du niveau central (cerveau) au niveau périphérique (muscle). L'arrivée d'un potentiel d'action, dans la terminaison nerveuse, permet l'ouverture de canaux calciques, voltage dépendant induisant une augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire. Cela provoque une migration des vésicules d'acétylcholine (Ach) (neurotransmetteur spécifique des motoneurones) vers la membrane présynaptique. L'exocytose de l'Ach est assurée par le complexe SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) sous forme de *quantum*. Chaque *quanta* correspond à environ 10 000 molécules d'ACh qui vont se fixer aux récepteurs de l'Ach (RAch). L'ensemble des récepteurs compose la plaque motrice (Figure 3), qui a la particularité de modifier la répartition des récepteurs au cours de la maturation, et ainsi permettre l'optimisation de la communication entre l'axone et le muscle.



**UNIVERSITE** 

PARIS DESCARTES



terminaisons axonales d'un motoneurone alpha (unité motrice)

terminaison axonale + plaque motrice



Figure 3 : photographies représentatives des terminaison axonales et de leur plaque motrice (http://histoblog.viabloga.com/texts/letissu-musculaire-strie)



A la naissance, les RAch forment un ovale homogène (plaque uniforme), d'une concentration de RAch d'environ  $10000/\mu m^2$ , puis ils se regroupent et se réorganisent par invagination, pour voir apparaître des perforations (plaque perforée). Lorsque la maturation est terminée, on observe une ligne relativement épaisse, présentant une structure caractéristique nommée bretzel (ou pretzel), avec une concentration de RAch de  $10/\mu m^2$ . La terminaison axonale et le bretzel concordent parfaitement, permettant ainsi le passage, de manière rapide et fiable, de l'information nerveuse. Cette structure est labile, et s'adapte en fonction de l'évolution des fibres musculaires. Ainsi, elle peut être amenée à s'accroître davantage au fur et à mesure qu'un muscle grossit, ou bien à se réorganiser lors de dommages musculaires.

PARIS DESCARTES

Les fibres musculaires, situées en post synaptique, sont le résultat de la fusion de plusieurs cellules musculaires, il s'agit donc de cellules polynucléées, de 10 à 100 µm de diamètre. Elles sont réunies en faisceaux, séparés par des tissus conjonctifs (épimysium, périmysium, endomysium).

Chaque fibre musculaire est constituée de myofibrille, elle-même composée d'un ensemble de protéines contractiles : les myofilaments. Cette structure est subdivisée en sarcomère (Figure 4) caractérisé par les bandes I (isotropes), composées de filaments fins d'actine, et par la bande A (anisotrope) composée de filaments épais de myosine.



Figure 4 : Dessins représentatifs des caractéristiques d'un sarcomère



Ces filaments se chevauchent lors de la contraction (Figure 4) et forment les stries Z, au niveau des bandes I, et, la strie H, au niveau de la bande A. La contraction musculaire est permise grâce à différentes protéines contractiles, dont la myosine. Les têtes de myosine, localisées sur le filament épais, permettent via l'utilisation d'ATP, la contraction ou le relâchement musculaire.

PARIS DESCARTES

L'isoforme de la chaîne lourde de myosine évolue, au cours du développement et durant le reste de la vie de l'individu, pour permettre au muscle de répondre aux stimulations nerveuses. Il existe différentes isoformes de myosine : embryonnaire, néonatale, I, IIa, IIx-b. Dans un muscle adulte, seules sont présentes les isoformes I, IIa, IIx-b, dites respectivement fibres lentes, fibres intermédiaires et fibres rapides.

Les fibres de type I sont riches en mitochondries, fortement vascularisées, ce qui permet un métabolisme oxydatif important. Cela leur confère une résistance à la fatigue, permettant un exercice de longue durée.

Les fibres de type IIx-b sont les fibres de plus gros diamètre. Elles sont peu vascularisées et leur concentration en mitochondries est relativement basse (Schiaffino and Reggiani, 2011). Elles utilisent préférentiellement un métabolisme glycolytique anaérobie, ce qui induit une fatigabilité de la fibre plus importante mais une force et une rapidité de contraction plus importante.

Les fibres de type IIa sont des fibres aux propriétés intermédiaires. Elles sont résistantes à la fatigue mais permettent une force de contraction relativement élevée.

Bien qu'ayant des caractéristiques de contraction différentes, ces types de fibres coexistent dans un même muscle. Cependant, suivant la répartition majoritaire, un muscle sera, plus ou moins, considéré comme muscle rapide ou muscle lent.

Les fibres musculaires, ainsi différenciées, sont en communication directe avec le motoneurone. On distingue ainsi, trois types d'unité motrice : les unités motrices rapides et fatigables (FF ; fast fatiguable), les unités motrices lentes (S ; slow), et les unités motrices résistantes et rapides (FR ; fast resistant). (Figure 5)







Figure 5 : Schéma représentatif des caractéristiques des unités motrices (Jami et al. 1982)

On observe une relation de proportionnalité entre la taille du soma et de l'axone et le nombre de fibres innervées. La taille des unités motrices est dépendante de la précision du mouvement : plus un mouvement doit être précis, plus le nombre de fibres innervées par unité motrice sera faible ; ainsi pour les muscles oculomoteurs, seules 3 ou 4 fibres sont innervées par motoneurone, et près de 2000 fibres innervées pour un motoneurone dans le quadriceps.

## 1. Les différentes unités motrices

### 1. Unité motrice FF

Les unités motrices FF sont caractérisées par une conductivité de l'ordre de 120m/s possible grâce à un axone de diamètre important et un motoneurone de large soma, supérieur à 600µm<sup>2</sup>. Ces unités motrices sont composées d'un grand nombre de fibres musculaires au métabolisme glycolytique (type IIx, IIb). Ces





dernières sont de diamètre important et sont recrutées lors d'efforts rapides et intenses. Ces unités motrices permettent une contraction de type phasique sur un temps n'excédant pas deux minutes.

## 2. Unité motrice S

Les unités motrices S sont caractérisées par une conductivité de l'ordre de 85m/s, l'axone est de plus petit diamètre, et leur motoneurone de soma inférieur à 300µm<sup>2</sup>. Les fibres innervées, moins nombreuses que pour les unités motrices FF, sont dites fibres lentes, ont un métabolisme oxydatif (type I), sont très vascularisées et de petit diamètre. Elles sont recrutées lors d'exercice de faible intensité mais pouvant durer plus d'une heure. Ces unités motrices permettent une contraction de type tonique.

## 3. Unité motrice FR

Les unités motrices FR sont caractérisées par une conductivité de l'ordre de 97m/s, l'axone est de diamètre moyen, et leur motoneurone de soma compris entre 300µm<sup>2</sup> et 600µm<sup>2</sup>. Les fibres innervées sont dites fibres intermédiaires (type IIa) et ont un métabolisme énergétique mixte avec une dominance du métabolisme oxydatif. Elles sont recrutées lors d'exercices d'intensité modérée durant quelques minutes.

## 2. Atteintes de l'unité motrice dans la SLA

Dans le contexte de la SLA, ce sont les unités motrices FF qui semblent les plus touchées (Frey et al., 2000; Gordon et al., 2010; Hegedus et al., 2007; Pun et al., 2006). Les motoneurones associés aux unités motrices S et FR semblent être plus résistants à la pathologie. On distingue, dans la SLA, deux populations de motoneurones : ceux sensibles impliqués dans les unités motrices rapides et ceux résistants impliqués dans les unités motrices lentes (Saxena, Cabuy, and Caroni 2009). L'étude des marqueurs tels que ATF3 (Cyclic AMP-dependent transcription factor 3) ou cJUn a mis en évidence une population de motoneurones plus sensible à





la SLA, plusieurs semaines avant la dégénérescence (Gonzalez de Aguilar et al., 2008; Malaspina et al., 2010; Vlug et al., 2005). Ces marqueurs interviennent dans la survie des neurones (Ham et al., 2000; Nakagomi et al., 2003) et peuvent donc être utilisés comme indicateurs de la dégradation neuronale.

## 3. Atteintes des motoneurones

La sensibilité à l'excitotoxicité glutamatergique est actuellement la seule atteinte cellulaire bénéficiant d'un traitement thérapeutique. Les motoneurones spinaux ont un taux élevé de récepteurs NMDA (N-methyl-D-Asparate) et la sousunité NR2B (NMDA receptor 2b) induirait une sensibilité des motoneurones à la SLA (Fuller et al., 2006). Or, les motoneurones innervant la langue auraient un très fort taux d'expression de cette sous-unité à l'inverse des motoneurones innervant les muscles oculomoteurs (Fuller et al., 2006). Cette différence d'expression de la sousunité NR2B pourrait être une explication à l'atteinte différentielle de ces motoneurones.

Cependant, de nombreuses autres atteintes des motoneurones ont été observées. En 2006, Kanai et ses collaborateurs démontrent, dans des motoneurones de patients, l'altération des propriétés électrophysiologiques, notamment une hyperexcitabilité axonale (Kanai et al., 2006). Une seconde équipe démontre une hyperpolarisation membranaire (Vucic et al., 2007). Ces altérations viennent confirmer les dysfonctionnements (Kuo et al. 2005) des canaux potassiques et sont des arguments pour une atteinte particulière des motoneurones dans la SLA.

Les études sur les modèles animaux montrent dès l'âge embryonnaire une altération des propriétés électriques et morphologiques des motoneurones des souris SOD1(G93A) avec une hyperexcitabilité due à l'augmentation des courants entrants sodiques persistants (Kuo et al., 2005). Dans la période post natale, de P4 à P10, l'arborisation dendritique du modèle SOD1G85R, est défectueuse, la ramification et la croissance anormale des dendrites supposent un défaut dans la sélection et l'élagage des dendrites supplémentaires (Amendola, 2008; Amendola et al., 2007). Le possible retard de maturation dépendrait de la perturbation du transport axonal



dès l'âge embryonnaire et serait lié aux propriétés toxiques de la SOD1 mutée (Kieran et al., 2007).

PARIS DESCARTES

De nombreuses études ont mis en évidence, dans la SLA, une sensibilité des motoneurones à l'apoptose (mort programmée de la cellule) et cela dès la phase asymptomatique. Des travaux montrent une augmentation des marqueurs des voies de signalisation de mort cellulaire (Raoul et al., 2006) et une modulation des niveaux transcriptionnels et traductionnels de protéine anti-apoptotique (BCL2) et pro-apoptotique (BAX) (Mu et al., 1996).

Cette augmentation de sensibilité à l'apoptose est liée aux défauts de régulation du stress oxydant. Comme précédemment décrit, la protéine SOD1 est une protéine anti oxydante. Son gain de fonction toxique induit des agrégats, et les neurones doivent faire face à une augmentation très importante des radicaux libres oxygénés (ROS, Reactive Oxygen Species) (Halliwell, 2006). La perte des fonctions mitochondriales, diminution de la capacité de stockage de l'ion calcium (Ca<sup>2+</sup>), fragilise aussi les motoneurones (Higgins et al., 2003; Jung et al., 2002). De plus, la respiration mitochondriale ainsi que la synthèse d'ATP sont diminuées (Jung et al., 2002). Cette diminution d'énergie est fortement délétère au motoneurone qui peine à actionner les pompes calciques pour l'efflux de Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique vers le milieu extracellulaire. Cette altération du système de régulation du stress oxydant est un des arguments pour expliquer la sensibilité préférentielle des unités motrices FF. En effet les unités motrices FR et S possèdent un système d'oxydation/réduction plus efficace, et sont donc moins sensibles au stress oxydant et à l'apoptose.

## 4. Atteintes des jonctions neuromusculaires

La faiblesse musculaire est une caractéristique évidente dans la SLA, mais différencier les atteintes nerveuses des atteintes musculaires est difficile. Une équipe a mis en place un protocole permettant de stimuler le muscle ou le nerf et a mesuré les cinétiques de contraction, la fatigabilité et la force du diaphragme ou du muscle *soleus* (Rizzuto et al., 2015). Dans les souris SLA, les jonctions neuromusculaires présentent des défaillances qui sont fonctionnellement séparées des atteintes musculaires. Ces données sur le stade tardif de la maladie complète une étude





réalisée en phase pré-symptomatique mettant en évidence une dénervation des JNM dès P47 (Fischer et al., 2004) et une diminution des plaques matures de type bretzel dans le *soleus* (Rizzuto et al., 2015).

## 5. Atteintes des muscles

L'atteinte musculaire est une des caractéristiques de la SLA. Cependant l'atrophie (diminution de la taille des fibres) et l'aplasie (diminution du nombre de fibres) ne sont décrites qu'à partir de P90 dans la souris. Ces atteintes induisent une diminution de la force motrice. Comme au niveau des motoneurones et des jonctions neuromusculaires, ce sont les muscles ayant des fibres rapides qui seront les plus touchés. Ainsi, pour les muscles du mollet, le *tibialis,* majoritairement composé de fibres de type IIb, présente une diminution de sa force contractile dès P40, alors que le *soleus*, majoritairement composé de fibres lentes, conserve sa force contractile.

Des altérations des mitochondries ont été observées dans les fibres musculaires des patients SLA (Afifi et al., 1966). Ces altérations ont été retrouvées dans le modèle murin SOD1(G93A) (Leclerc et al., 2001). Les mitochondries présentent des vacuoles et s'accumulent au niveau des jonctions neuromusculaires (Zhou et al., 2010). Les dysfonctionnements mitochondriaux induisent une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire et une chute de l'expression de la citrate synthase (Vielhaber et al., 2000), enzyme catalysant la première réaction du cycle de Krebs (Srere et al., 1973).

Le stress oxydant est aussi retrouvé au niveau des fibres musculaires. Le gain de fonction toxique de la SOD1 entraîne, comme dans les motoneurones, un défaut de régulation et d'élimination des ROS (Gonzalez de Aguilar et al., 2008). L'accumulation de ces derniers dans le cytoplasme active l'autophagie, induit le déclenchement du stress oxydant des fibres avoisinantes (Zhou et al., 2010) et des motoneurones par transport rétrograde (Kraft et al., 2007).

## 2.Les cellules gliales

Les cellules gliales sont souvent définies comme des cellules de soutien aux neurones. Mais depuis quelques années, il a clairement été démontré qu'elles





avaient un rôle à part entière dans le maintien de l'homéostasie, la communication cellulaire, et la neurotransmission (Syková and Chvátal, 2000). Les cellules gliales peuvent être réparties en deux catégories : les cellules myélinisantes (cellules de Schwann, oligodendrocytes) et les cellules non myélinisantes (microglie, astrocyte).

## 1. Cellules myélinisantes

Les cellules de Schwann et les oligodendrocytes assurent la formation de la gaine de myéline, gaine entourant les axones pour permettre la conduction saltatoire de l'influx nerveux. Au niveau central, les oligodendrocytes participent à la survie des neurones via la sécrétion de GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (Wilkins et al., 2003). Au niveau périphérique, les cellules de Schwann permettent un support synaptique et la régénération nerveuse (Chen et al., 2007; Woodhoo and Sommer, 2008).

## 2. Atteinte des cellules myélinisantes dans la SLA

Dans la SLA, des altérations des oligodendrocytes comme des cellules de Schwann ont pu être mises en évidence aussi bien chez les patients [modification de la myéline du faisceau pyramidal (Delisle and Carpenter, 1984)] que chez les souris [diminution du nombre d'oligodendrocyte dans la moelle épinière (Ito et al., 2009)].

Au niveau périphérique, les patients SLA présentent une altération de la myéline (Perrie et al., 1993), observée aussi dans les modèles souris (Nonneman et al., 2014). Une souris chimérique a été réalisée avec une surexpression de la SOD1 mutée exclusivement dans les cellules de Schwann ; la durée de vie et la locomotion de ces souris sont semblables à celles des contrôles (Turner et al., 2010). Une seconde souris chimérique a été réalisée, avec l'excision de la protéine SOD1 mutée exclusivement dans les cellules de Schwann, contre toute attente cette ablation accélère la pathologie (Lobsiger et al., 2009). La modulation de ces cellules induit une diminution de libération d'IGF-1 (insulin growth factor) et limite ainsi la pousse





axonale au niveau des jonctions dénervées. Les cellules de Schwann semblent résistantes à l'accumulation de la protéine SOD1 mutée.

L'atteinte des cellules myélinisantes ne serait pas une des premières atteintes mais une cible secondaire de la pathologie.

## 3. Cellules non myélinisantes

On distingue deux grandes classes, la microglie et les astrocytes.

La microglie est une sous-catégorie des cellules immunitaires. Une activation de la microglie peut être observée lors d'inflammation du système nerveux central, avec changement conformationnel et modulation du profil sécrétoire (Henkel et al., 2009).

Les astrocytes sont importants au développement et au fonctionnement des neurones. Ils sécrètent de nombreux facteurs neurotrophiques (Rothstein et al., 1996). Ces cellules sont nécessaires aux motoneurones car elles sont le lieu de stockage du lactate, et permettent, via des pompes ioniques, le maintien de l'homéostasie du milieu extracellulaire. D'autre part, elles participent au bon fonctionnement de la fente synaptique.

## 4. Atteintes des cellules non myélinisantes

Une des caractéristiques de la SLA est une astrogliose réactionelle dans la moelle épinière (prolifération et activation des astrocytes) chez les patients mais aussi chez les souris (Hall et al., 1998; Kushner et al., 1991). L'astrogliose est un phénomène de préservation permettant la réparation des synapses et la neurogénèse. Mais dans le cas pathologique de la SLA, cette astrogliose serait délétère et participerait à la mort des motoneurones (Yamanaka et al., 2008).

Les astrocytes permettent de capter le glutamate synaptique pour le convertir en glutamine, acide aminé non toxique pour les neurones (Rothstein et al., 1996), via la glutamine synthetase. Les astrocytes activés des souris SLA présentent une inefficacité de recaptage du glutamate, due à une diminution du nombre de





transporteurs EAAT2 à la membrane, et participent ainsi à l'amplification de l'excitotoxicité glutamatergique (Ferrarese et al., 2001). La SOD1 mutée catalyse l'oxydation de la partie C terminale cytosolique de EAAT2, induisant une inhibition post traductionnelle des transporteurs (Trotti et al., 1999).

Les patients SLA présentent, au niveau des astrocytes, une diminution du transporteur du lactate MCT-1 (Monocarboxylate transporter-1). Le défaut de recapture du glutamate et une diminution d'entrée du glucose (Brekke et al., 2015; Magistretti, 2009), entraînent une chute de concentration du lactate dans les astrocytes. La quantité de lactate disponible, pour les motoneurones, est donc fortement diminuée. Pour permettre leur activité synaptique, la principale source d'énergie dépendra de la glycolyse aérobie. Cette adaptation induit une production de ROS, et rend les motoneurones plus sensibles au stress oxydant (Herrero-Mendez et al., 2009).

L'activation des astrocytes induit une surexpression des récepteurs AMPA (acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthl-4-isoxazolepropionique) dans les motoneurones. Ces derniers, perméables au Ca<sup>2+</sup> (Van Damme et al., 2007), permettent l'augmentation du calcium intracellulaire, facteur d'activation d'autophagie.

En plus de ces modulations particulières, le profil sécrétoire des astrocytes est aussi modulé. Une diminution des facteurs neurotrophiques, tels que BDNF, CNTF et GDNF, est observée chez les patients SLA (Ekestern, 2004). Ce qui entraîne une modulation de la survie et de la plasticité des neurones environnants (Wyman et al., 1999). Une diminution du facteur angiogénique VEGF va moduler la croissance des neurites et la neurogénèse (Jin et al., 2002; Sondell et al., 2000), or dans la SLA, aussi bien chez les patients que dans le modèle souris SOD1(G93A), une diminution de VEGF a été observée (Lambrechts et al., 2003). L'ensemble de ces éléments favorise la dégénérescence spécifique et sélective des motoneurones.

Les cellules gliales, malgré leur caractéristique de cellules de maintien, participent de manière secondaire à la mise en place de la pathologie et à l'aggravation des symptômes (Morrison et al., 2013).





# 5. Métabolisme énergétique dans la SLA

Les patients SLA souffrent d'une diminution de la masse corporelle (Vaisman et al., 2009) associée à une diminution progressive des réserves lipidiques et de la masse musculaire (Bouteloup et al., 2009; Dupuis et al., 2011; Jawaid et al., 2010). L'indice de masse corporelle (IMC) est intimement corrélée avec la sévérité de la pathologie (O'Reilly et al., 2013). La compréhension de l'origine de l'hypermétabolisme, dont les causes ne sont pas encore identifiées, permettrait une avancée dans les possibilités de traitements. Ces symptômes suggèrent un dysfonctionnement métabolique dans la SLA.

# 1. Perturbation de l'homéostasie du glucose dans la SLA

La glycolyse est le métabolisme de dégradation du glucose. L'utilisation d'une molécule de glucose permet la formation de deux molécules de pyruvate, deux molécules d'ATP, deux molécules de NADH. Le Pyruvate peut avoir deux devenirs : soit entrer dans la mitochondrie et participer au cycle de Krebs, soit être converti en lactate. Le devenir à l'issue de ce carrefour dépend, au moins en partie, de l'état de phosphorylation de la PDH.

La GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) permet la phosphorylation oxydative du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3diphosphoglycérate. Il s'agit de la sixième étape de la glycolyse et la seule réaction d'oxydation réversible. L'étude de cette protéine, présente dans de nombreuses espèces, permet d'envisager le fonctionnement de la glycolyse dans un tissu donné.

La PDH (pyruvate deshydrogenase) permet le passage du pyruvate dans la mitochondrie. Son état d'activation est inversement proportionnel à son état de phosphorylation. On dénombre quatre isoformes de kinase dédiées à la phosphorylation de PDH chez l'homme (PDK1, PDK2, PDK3, PDK4) (Popov et al.,





1994). Seule l'isoforme PDK2 est exprimée dans une majorité de tissus. PDK1 est spécifique des cellules cardiaques, PDK3 est exprimée dans les testicules et PDK4 est la sous-unité la plus abondante dans les muscles squelettiques. En plus de l'action des PDK, une autre classe d'enzyme participe à la régulation de la phosphorylation de PDH, ce sont les PDP (pyruvate dehyrogenase phosphatase). Ainsi, le devenir du pyruvate est finement régulé au niveau de l'entrée dans la mitochondrie.

Mais pour permettre la dégradation du glucose en pyruvate, puis en ATP, le glucose doit d'abord être présent dans le cytoplasme. Au sein des muscles squelettiques, le transporteur majoritaire du glucose, permettant le passage de celuici du milieu sanguin au milieu intracellulaire, est nommé GLUT4.

## 1. Les transporteurs du glucose : GLUT4

Au niveau des cellules musculaires, GLUT4 représente 90% des transporteurs du glucose (Holman et al., 1990; Marette et al., 1992). La distribution subcellulaire du récepteur au niveau des fibres musculaires est finement régulée et permet de moduler la captation du glucose cellulaire. Le passage de celui-ci, du milieu sanguin au milieu cytoplasmique, dépend du gradient de concentration, du nombre et de l'activité de GLUT4 à la membrane plasmique ou au niveau des tubules T. La modulation de la quantité et de l'activité de GLUT4 est dépendante, de l'insuline. Les transporteurs sont situés dans des vésicules sous membranaires. Les contractions musculaires ou l'activation de la voie insulinique vont permettre la translocation des récepteurs GLUT4 à la membrane (Douen et al., 1989; Hirshman et al., 1988; Klip et al., 1987; Roy and Marette, 1996) aussi bien au niveau des fibres oxydatives que glycolytiques (Dohm et al., 1993; Marette et al., 1992).

La translocation de GLUT4 due à l'insuline est permise par l'activation de la voie PI3K/Akt (Cong et al., 1997; Hajduch et al., 1998; Kohn et al., 1996; Wang et al., 1999), tandis que la translocation due à la contraction musculaire serait en partie initiée par l'augmentation de calcium intracellulaire (Holloszy et al., 1986). De nombreuses études ont mis en évidence l'effet combiné de l'insuline et de la contraction musculaire sur la translocation de GLUT4 avec un effet synergique des deux voies (Gao et al., 1994; Nagano et al., 1979; Pradat et al., 2010).




#### 2. Altération du métabolisme glucidique dans la SLA.

#### 1. Les patients

Une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline ont été observées chez les patients SLA. L'origine de l'intolérance au glucose est controversée et pourrait être un symptôme spécifique de la maladie ou juste une conséquence de l'atrophie musculaire (Reyes et al., 1984). Il a aussi été suggéré que cette intolérance était associée à l'augmentation des niveaux d'acides gras circulants induisant la résistance à l'insuline (Pradat et al., 2010).

En 1987, une étude a montré une diminution de l'utilisation du glucose au niveau du système nerveux central (CNS) dans les patients SLA (Dalakas et al., 1987). De récentes études *post mortem*, montrent une accumulation du glycogène et du glucose dans la substance grise de patients SLA masculins (Dodge et al., 2013).

#### 2. Les souris

Au niveau des modèles souris SOD1(G93A), un lien a été mis en évidence entre les défauts mitochondriaux et un défaut de la captation du glucose dans le CNS, diminuant ainsi la production d'ATP (Browne et al., 2006; Miyazaki et al., 2012). La captation du glucose a été étudiée dans deux modèles différents : SOD1(G93A) (Fischer et al., 2004; Smittkamp et al., 2014) et SOD1(G86R) (Dupuis et al., 2004; Palamiuc et al., 2015). Les résultats mettent en évidence une augmentation, significative ou non, de la captation du glucose après une période de jeûne suivie d'une injection de glucose.





# 2.AMPK : carrefour métabolique régulant le métabolisme énergétique

L'AMPK (Adénosine Mono Phosphate Protéine Kinase) est une des enzymes clés de la régulation de l'homéostasie énergétique (Richter and Ruderman, 2009), et intervient dans un ensemble de processus cellulaires qui lui donne un rôle central dans l'interaction des différents métabolismes énergétiques.

AMPK est une protéine hétérotrimérique composée : d'une sous-unité catalytique ( $\alpha$ ), et deux sous-unités régulatrices ( $\beta$  et  $\gamma$ ) (Carling et al., 2012; Hardie, 2007), ayant différentes isoformes ( $\alpha$ 1  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1  $\beta$ 2 et  $\gamma$ 1  $\gamma$ 2  $\gamma$ 3). Chaque sous-unité est codée par un gène distinct, et permet, théoriquement, douze combinaisons hétérotrimériques  $\alpha\beta\gamma$  différentes.

Ces différentes combinaisons d'AMPK permettent d'envisager des propriétés tissus spécifiques. Ainsi dans le muscle humain la représentation majoritaire est l'hétérotrimère  $\alpha 2\beta 2\gamma 3$  (Mahlapuu et al., 2004).

La sous-unité  $\alpha$  possède un domaine kinase, ainsi qu'un domaine d'autoinhibition et un domaine d'interaction avec les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . La localisation cytoplasmique et nucléaire de l'isoforme  $\alpha$ 2 permet de contrôler, par phosphorylation des facteurs de transcription, un certain nombre de gènes du métabolisme énergétique (Kawaguchi et al., 2002).

Cette enzyme, régulée de façon allostérique, est stimulée par AMP et inhibée par l'ATP, sur le même site de fixation. Le ratio cellulaire AMP/ATP (Cheung et al., 2000) permet la phosphorylation d'AMPK au niveau du résidu Thr172, sur la sous-unité catalytique. La liaison d'AMPK à l'AMP, au niveau de la sous-unité  $\gamma$ , protège l'enzyme de déphosphorylation.



Figure 6 : Représentation des différentes cibles d'AMPK (Grahame et al. 2014)

#### 1. Rôles biologiques

#### 1. AMPK et métabolisme glucidique

La protéine AMPK est liée au métabolisme glucidique dans son intervention dans la translocation de GLUT4 à la membrane. En effet, elle joue un rôle sur l'expression de TBC1D1 (TBC domain family 1), protéine régulant le taux de GLUT4 à la membrane (Chen et al., 2011).

#### 2. AMPK et métabolisme lipidique

Dans des cas de faible niveau d'énergie, AMPK inhibe la synthèse lipidique par phosphorylation de certaines enzymes telles que ACC1 (Acetyl CoA Carboxylase 1) qui permet l'activation de CPTI (Carnitine Palmitoyl-Transferase I) enzyme favorisant la beta oxydation et la production d'énergie par lipolyse (Hardie and Pan, 2002).

INE PAR





AMPK intervient aussi dans la régulation :

- de la lipogenèse *de novo* via SREBP1 (Sterol regulatory elementbinding protein 1), et FAS (Fatty acid synthase)

- du cholestérol via HMGCR (Hydroxy-methylglutaryl CoA Reductase)

#### 3. AMPK et autophagie

L'AMPK joue un rôle dans l'initiation de l'autophagie en phosphorylant ULK1 (Kim et al., 2011) et en inhibant l'activité de mTOR (mamalian target of rapamycin). L'ensemble de ces deux actions lui permet donc d'activer l'autophagie.

#### 2. AMPK et SLA

Une augmentation de la phosphorylation d'AMPK a été observée dans la moelle épinière des souris SLA SOD1(G93A) dès le début des symptômes (Perera et al., 2014). Ces données sont retrouvées dans la moelle épinière des patients (Chen et al., 2015).

Dans le modèle souris SOD1(G93A), l'activation d'AMPK avec de la metformin accélère la pathologie (Kaneb et al., 2011). A l'inverse, dans la même souche de souris, l'activation d'AMPK avec du latrepirdine ou du resvératrol montre une augmentation de la durée de vie, et un retard d'apparition des symptômes (Coughlan et al., 2015; Mancuso et al., 2014). Ces effets bénéfiques seraient dus à une amélioration de l'autophagie et de la biogénèse mitochondriale dans les motoneurones.

D'autres études se sont intéressées aux cibles d'AMPK, notamment PGC1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha). Une ablation de ce gène induit une aggravation de la pathologie (Eschbach et al., 2013), tandis qu'une surexpression est bénéfique (Liang et al., 2011). Ces effets bénéfiques ont pu être attribués à une activité de PGC1 $\alpha$  au niveau de la moelle (Da Cruz et al., 2012) mais pas au niveau du muscle (Zhao et al., 2011).



Ainsi, la signalisation cellulaire d'AMPK semble jouer un rôle important dans la mise en place de la pathologie en modulant différentes voies métaboliques.

### 3. Hypermétabolisme lipidique dans la SLA

#### 1. Les lipides : Les acides gras

Les acides gras (AG) constituent une ressource en énergie non négligeable. En effet, le pouvoir calorifique d'un gramme d'AG est d'environ 37kJ contre 17 pour un gramme de glucose. Les AG sont stockés sous forme de triglycérides (TG), molécule composée de trois AG, d'une fonction ester et d'un glycérol. Les AG possèdent une chaîne carbonée allant de 4 à 36 carbones, au-delà de 14 carbones on parlera d'AG à longue chaîne. L'importante quantité de carbone confère à la molécule ses propriétés hydrophobes.

#### 1. Origines des acides gras

DESCARTES

Les AG utilisés dans le métabolisme énergétique proviennent de deux sources principales : une synthèse *de novo* (lipogenèse), ou de l'alimentation. Les deux processus sont complémentaires, car certains AG ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme tels que les AG oméga3 (w3) et oméga6 (w6) mais n'en restent pas moins essentiel.

#### 2. Transport des acides gras

Les AG sont stockés au niveau du foie sous forme de TG. Ces derniers sont véhiculés jusqu'au tissu d'intérêt via des apolipoprotéines telles que les VLDL (very low density lipoprotein) ou les chylomicrons. Les AG se fixent aussi à l'albumine, permettant ainsi la libre circulation dans le sang et la facilité d'absorption au niveau des tissus.





Lorsqu'ils ne sont pas liés, les AG se retrouvent libres dans la cellule et peuvent être dégradés via la béta oxydation avant de rentrer dans le cycle de Krebs pour permettre la production d'ATP.

#### 3. La bêta-oxydation

La β-oxydation, ou Hélice de Lynen, est la principale voie métabolique de dégradation des AG. Elle se déroule dans la matrice mitochondriale et correspond à des « tours » successifs permettant la production d'Acétyl-CoA.

Pour permettre la dégradation des AG à longue chaîne, ces derniers doivent être activés avant d'être pris en charge par la carnitine acyl-transférase I (CPT I). Cette navette permet la conversion en acylcarnitine. Ce dernier se retrouve dans l'espace intermembranaire mitochondrial via une porine. L'entrée dans la mitochondrie se fait par l'action d'une enzyme fonctionnant comme un anti port, la carnitine acyl-translocase. Elle échange un acylcarnitine contre une molécule de carnitine, produit de la restitution du groupe acyl à un CoA sous l'action de la carnitine acyl-transférase II (CTP II). Une fois dans la mitochondrie, les AG se retrouvent pris en charge par le cycle de Krebs.

Les AG sont donc la source d'énergie la plus rentable pour l'organisme, mais leur utilisation demande un laps de temps plus long que pour une molécule de glucose.

#### 2. Altération du métabolisme lipidique dans la SLA

#### 1. Les patients

Une étude a mis en évidence une augmentation de la clairance lipidique chez les patients SLA (Chiò et al., 2009; Dorst et al., 2011; Dupuis et al., 2008; Lacomblez et al., 2002). Certaines lipoprotéines, notamment les HDL (Hight density lipoprotein) qui permettent le transport du cholestérol, sont diminuées tandis que le taux de triglycérides circulant est augmenté (Murai et al., 1983). De plus, une corrélation négative a été démontrée entre le niveau circulant de APOE (apolipoprotéine E) et la durée de vie (Lacomblez et al., 2002).





L'ensemble de ces résultats a amené à proposer aux patients un régime riche en lipide permettant une amélioration de l'état de santé des patients (Dupuis et al., 2004; Lehéricey et al., 2012).

#### 2. Les souris

L'augmentation du métabolisme énergétique et la diminution de la masse corporelle induisent une balance énergétique négative qui n'est pas dépendant de la prise alimentaire (Dupuis et al., 2004). Ces variations se caractérisent par une clairance des triglycérides et diglycérides intramusculaires (Fergani et al., 2007) induisant une résistance à l'insuline. Ces analyses métaboliques suggèrent un hypermétabolisme lipidique, entraînant une diminution des réserves de lipides de l'ensemble de l'organisme.

# 4.Altération du processus d'autophagie dans la SLA

« Autophagie », mot issu du grec ancien,  $\alpha$ uto : soi-même et  $\varphi \alpha \gamma \epsilon iv$  : manger, est le processus par lequel une cellule va dégrader ses propres éléments pour combler une demande importante en énergie. On peut observer l'activation de l'autophagie lors du développement, de la différentiation cellulaire, de la survie cellulaire, du vieillissement, mais aussi lors des processus inflammatoires et des réponses immunitaires. Dans une situation basale, le niveau d'autophagie est relativement faible, il tend à augmenter lors d'un jeûne, d'un exercice physique ou bien lors de cas pathologiques (Levine and Kroemer, 2008).

Le mécanisme de l'autophagie varie suivant la taille de l'élément à dégrader. Elle est divisée en trois sous parties : la micro-autophagie, l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA ; chaperone-mediated autophagy) et la macroautophagie.





#### 1. La micro-autophagie

Utilisé pour la première fois en 1966 (De Duve and Wattiaux, 1966), le terme micro-autophagie décrit l'invagination de la membrane lysosomale pour enclaver des agrégats ou des constituants cytoplasmiques et les dégrader via les enzymes lysosomales (lipases, protéases, nucléases, glycosides hydrolases).

## 2. L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA)

Les protéines, cibles de cette voie de dégradation, possèdent une séquence consensus KFERQ, ces séquences sont reconnues par les protéines chaperonnes HSC70 (heat schock cognate protein of 70 KDa) qui assurent l'adressage à la protéine LAMP-2A (lysosomal associated membran protein type 2A) (Cuervo and Wong, 2014) (Figure 7). La protéine est ensuite transloquée dans le lysosome où elle est ensuite dégradée par les hydrolases lysosomales.

La CMA peut être activée en réponse au stress oxydant (Kiffin et al., 2004), ou lors d'un jeûne (Cuervo et al., 1995). Chez les rongeurs, durant les premières heures de jeûne (4 à 6h), il y a activation de la macro-autophagie, et à partir de 8h, il y a activation de la CMA, qui restera activée à son maximum durant trois jours.



Figure 7 : Représentation de l'identification de la séquence consensus et adressage au lysosome dans la CMA (Cuervo et al. 2014)





#### 3. La macro-autophagie

La macro-autophagie permet la dégradation des protéines à longue durée de vie, les agrégats protéiques, les organites endommagés, les lipides ainsi que d'autres composés cellulaires. Elle sera désignée sous le nom d'autophagie dans la suite de la thèse. Elle est caractérisée par quatre étapes permettant une régulation fine de ce processus ; 1-l'initiation, 2-l'élongation, 3-la fusion, 4-la dégradation. A chaque étape, le complexe membranaire prend un nom particulier, on parle ainsi de phagophore, d'autophagosome, d'amphisome et d'autolysosome. Découverte en 1963 par le professeur Duve à la suite d'observation de coupes en microscopie électronique, les autophagosomes et leur régulation ont fait l'objet de nombreuses études. Une trentaine de gènes a ainsi pu être identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, comme participant au processus d'autophagie. Ils sont regroupés sous le terme *Atg* (autophagy related gene) (Klionsky et al., 2003; Tsukada and Ohsumi, 1993) et un bon nombre d'entre eux possèdent leur orthologue chez les mammifères.

Yeast	Mammals	Functions
Atg1	ULK1, ULK2	Protein Kinase: Atg1-Atg13-Atg17-Atg29 complex
Atg2	Atg2	Atg9/Atg2-Atg18 complex
Atg3	Atg3	E2-like enzyme for Atg8s-lipidation
Atg4	Atg4A, B, C, D	Cysteine protease: Atg8s-activation and delipidation
Atg5	Atg5	Atg12-Atg5 conjugate: E3-like activity for Atg8s-lipidaton
Atg6	Beclin-1	Subunit of Vps34 PI3K complex
Atg7	Atg7	E1-like enzyme for Atg12- and LC3-conjugation
Atg8	LC3, GATE-16,	Modifier: Conjugates to PE to localize to Autophagosome
1999-199 <del>7</del> -1991	GABARAP	
Atg9	Atg9L1, L2	Atg9 interacts Atg2-Atg18 complex: membrane-bound
Atg10	Atg10	E2-like enzyme for Atg12-conjugation
Atg12	Atg12	Modifier: Conjugates to Atg5
Atg13	Atg13	mTor signaling: Atg1-Atg13-Atg17-Atg29 complex
Atg14	Atg14	Subunit of Vps34 PI3K complex
Atg16	Atg16L	Complex between Atg16 and Atg12-Atg5 conjugate
Atg17	FIP200	Atg1-Atg13-Atg17-Atg29 complex
Atg18	WIPI-1, 2, 3, 4	Atg9/Atg2-Atg18 complex
Atg29	?	New Standard Contraction Contraction Contraction Contraction

#### Autophagy-related genes





#### 1. L'initiation

La double membrane à l'origine de l'autophagosome proviendrait de différentes sources telles que la mitochondrie, l'appareil de Golgi ou bien le réticulum endoplasmique (RE) (Weidberg et al., 2011). La formation du phagophore dépend de deux principaux complexes protéiques faisant intervenir des protéines Atg: d'une part le complexe ATG1/ATG17 et ATG13, et d'autre part le complexe VPS34 (vacuolar protein sorting 34), ATG14 et Beclin1 (Atg6). La formation de ces complexes est nécessaire à l'activation de VPS34, qui induit la production de PIP3 (phospatidylinositol-3-phosphate), et à l'initiation de l'autophagie (Kroemer et al., 2010; Mizushima et al., 2011). L'étude de l'initiation de l'autophagie dans des modèles cellulaires ou des modèles animaux, requiert l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des PI3K (phospatidylinositol-3-kinase). Les plus couramment utilisés sont la 3-méthyladénine (3-MA), la wortmannine, ou le LY294002 (2morpholin-4-yl-8-phenylchromen-4-one) (Blommaart et al., 1997; Wu et al., 2014). D'autres études utilisent des siRNA (small interfering RNA) invalidant le gène Beclin-1 permettant ainsi l'inhibition de la formation des phagophores (Qu et al., 2007; Yue et al., 2003).

#### 2. L'élongation

La deuxième phase est l'élongation du phagophore et la fermeture de ce dernier pour former l'autophagosome, une structure à double membrane, qui emprisonne les protéines ou organelles à dégrader. Deux systèmes « ubiquitin-like protein » interviennent dans ce processus. Le premier complexe, ATG12/ATG5, se lie de manière covalente grâce à la participation de ATG7/ATG10. ATG16L1 se lie au complexe de façon non covalente et lui donne des propriétés de ligase. Ce complexe va permettre la liaison entre ATG8 (MAP1LC3 microtubule-associated-protein 1 light chain3, nommée LC3B par la suite) et les phagophores (Mizushima et al., 2004). Le second complexe permet la formation d'un conjugué lipidique entre LC3B et de la phosphatidyléthanolamine (PE). La protéine pro-LC3B se trouve dans le cytoplasme, elle est clivée au niveau du COOH terminal par une protéase donnant ainsi la forme LC3B-I. LC3B-I se conjugue à la PE grâce à l'action de différents ATG pour aboutir à

#### UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES



la forme LC3B-II. LC3B-II s'associe à la membrane des autophagosomes et persiste même après la fusion au lysosome. Cette association stable et durable fait de LC3B-II un bon marqueur de l'étude de l'autophagie (Klionsky et al., 2003; Mizushima et al., 2004).

LC3B intervient aussi comme protéine de liaison pour permettre la dégradation des agrégats ubiquitinylé. En effet, la protéine P62 (SQSTM1, sequestosome 1) complexe d'une part avec l'ubiquitine et d'autre part se fixe à LC3B pour permettre la dégradation des agrégats via l'autophagie (Larsen et al., 2010).

#### 3. Maturation et fusion

Les autophagosomes se déplacent vers le centrosome, zone du cytoplasme riche en lysosome (Jahreiss et al., 2008) grâce au réseau de microtubules. Une altération de la polymérisation des microtubules, ou de la dynéine peut entraver l'autophagie. Les autophagosomes fusionnent dans un premier temps avec des endosomes précoces puis tardifs mettant en jeu les complexes COPI (Razi et al., 2009) et ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (Rusten and Stenmark, 2009). Le résultat de cette fusion, l'amphisome, fusionne par la suite avec les lysosomes pour donner les autolysosomes via les protéines SNAREs (soluble N-ethylameleimide sensistive factor attachement protein receptor) (Stroupe, 2011). Les hydrolases acides, présentes sur la surface interne des lysosomes, permettent un abaissement du pH et la dégradation du contenu vésiculaire. Les macromolécules sont ensuite exportées dans le cytoplasme pour être recyclées.

La fusion autophagosomes/lysosomes est une étape clé dans l'étude de l'autophagie. Ainsi l'utilisation de chloroquine, qui augmente le pH des lysosomes en neutralisant les protons, va inhiber la fusion des autophagosomes et des lysosomes et ainsi bloquer l'autophagie (Yoon et al., 2010).





### 4. Régulation de l'autophagie et voies de signalisation

L'autophagie fait partie des processus majeurs de régulation de l'homéostasie cellulaire. Pour permettre le maintien de cette homéostasie plusieurs voies de signalisation sont impliquées. La voie mTOR (mamalian/mechanistic target of rapamycin) est l'une des plus étudiées (Kim et al., 2011). Parmi les autres voies de signalisation on peut citer à titre d'exemples AMPK et PI3K (Klionsky et al., 2012).

#### **1.** *mTOR*

mTOR est une voie de signalisation composée de deux complexes MTORC1 (intervient dans la régulation de l'autophagie) et MTORC2 (intervient dans d'autres mécanismes cellulaires) (Hay and Sonenberg, 2004). MTORC1 est activé lorsque la quantité cytoplasmique en nutriment est élevée. Une fois activé, il empêche, par phosphorylation de ULK1/2 la formation du complexe ULK1/2-ATG13 (UNC-51-like kinase) inhibant ainsi la formation des phagophores. En cas de carence en acides aminés, mTOR est inactivé, il y a donc absence de phosphorylation de ULK1/2 et l'autophagie peut ainsi être induite.

L'inhibition de mTOR par la rapamycine (Huang and Houghton, 2001), inhibe la phosphorylation de ULK1/2-ATG13 et permet la formation du complexe et l'élongation du phagophore.

#### 2. PI3K/Akt

PI3K/Akt est une voie de signalisation étroitement liée à Bcl2 et mTOR. Elle est activée entre autres, par les voies de l'insuline et de la IGF-1 (insulin like growth factor 1). Son activation entraîne la phosphorylation de PI3K qui phopsphoryle à son tour Akt. Akt phosphorylé va activer mTOR (Ravikumar et al., 2010) et ainsi moduler l'autophagie. La phosphorylation d'Akt va induire une modulation transcriptionelle des gènes de l'autophagie en phosphorylant le facteur de transcription FoxO1/3a





(Forkhead box O1/3a) qui régule la transcription de différents gènes Atg dont LC3B (Zhao et al., 2007).

#### 3. AMPK

En plus de son rôle, décrit plus haut dans le métabolisme énergétique, l'AMPK intervient dans la modulation de l'autophagie. La diminution du rapport AMP/ATP active AMPK. Cela permet de réguler positivement l'autophagie en activant le complexe ULK1/2-ATG13 et en inhibant mTORC1 (Wirth et al., 2013). AMPK module aussi l'autophagie au niveau traductionnel en activant FoxO1/3a (Greer et al., 2007).

#### 5. Autophagie et SLA

Dans le cadre de la SLA, de nombreuses protéines, telles que TDP-43 ou SOD1, se retrouvent sous forme d'agrégats ubiquitinylés ou sous formes de corps de Bumina (voir I agrégats protéiques). Ainsi il a été montré, aussi bien chez la souris que chez les patients, que l'augmentation de l'autophagie améliore le trafic vésiculaire par diminution des agrégats protéiques (Li et al., 2008; Morimoto et al., 2007; Sasaki, 2010; Zhang et al., 2011). L'étude d'expression protéique de LC3B a permis de mettre en évidence une augmentation de la forme LC3BII au cours du temps. Pour appuyer ce résultat une étude de la phosphorylation de mTOR a été réalisée sur des coupes de moelle épinière. Le nombre de motoneurones présentant une phosphorylation de mTOR est fortement diminué dans les souris SOD1(G93A). Une autre étude montre une augmentation de l'expression des protéines de l'autophagie dans les muscles de souris SOD1(G93A) (Xiao et al., 2015). Le niveau d'expression de LC3B met en évidence une augmentation de l'autophagie dans ce modèle.

Cependant, une augmentation de l'autophagie dans la SLA reste controversée. En 2013, Crippa et collaborateur mettent en évidence une diminution de l'autophagie dans le même modèle (Crippa et al., 2013).

Les données montrant une augmentation de l'autophagie sont exclusivement réalisées au niveau protéique (Xiao et al., 2015; Zhang et al., 2011) alors que la



donnée montrant une diminution de l'autophagie dans la SLA est exclusivement réalisée en étudiant les transcrits des protéines (Crippa et al., 2013).

PARIS DESCARTES

Les traitements, pour activer ou inhiber l'autophagie, ne permettent pas, aujourd'hui, de conclure. L'inhibition de l'autophagie par injection de rapamycine dans le modèle souris SOD1(G93A) induit une augmentation de la dégénérescence des motoneurones, ainsi qu'une diminution de la performance musculaire (Bhattacharya et al., 2012; Zhang et al., 2011). Mais un traitement au lithium, drogue activant l'autophagie, montre le même type de résultat (Fornai et al., 2008; Pizzasegola et al., 2009).

Les défauts d'autophagie dans la SLA semblent être plus complexes qu'une simple augmentation ou diminution de l'activité.

Certains gènes associés à la SLA sont des gènes intervenant dans la régulation de l'autophagie (Cox et al., 2010; Ferguson et al., 2009; Rubino et al., 2012; Teyssou et al., 2013). La présence de mutation, notamment au niveau du gène SQSTM1/P62, amène une nouvelle hypothèse dans la pathologie, celle d'une altération de l'autophagie, indépendante des agrégats protéiques.

Une équipe a travaillé sur la relation causale entre Beclin1 et le développement de la pathologie (Nassif et al., 2014). Ils ont élaboré une souris SOD1(G86R) Beclin1 +/-, les souris double KO n'étant pas viables. La création d'une souris SOD1(G86R) sous-exprimant Beclin1 a permis de mettre en évidence l'effet délétère de la surexpression, d'environ 25 fois, de la protéine Beclin1. Ce modèle souris présente une augmentation de la durée de vie d'environ 10 jours, mais l'âge d'apparition des symptômes reste inchangé Leurs travaux concluent à une dérégulation de l'autophagie au niveau de l'initiation par fixation de la protéine SOD1 au niveau du complexe Bcl2/Beclin1 induisant une augmentation de la stabilité du dimère.





### 5. Conclusion métabolisme énergétique

Ainsi l'ensemble de ces atteintes métaboliques pourrait être à l'origine de la désorganisation des jonctions neuromusculaires dans la SLA (Holl et al., 2008) et de la perte sélective des unités motrices rapides (Frey et al., 2000; Hegedus et al., 2007; Pun et al., 2006; Saxena et al., 2009). Les fibres de type I utilisent préférentiellement un métabolisme lipidique et seraient, dans un premier temps, préservées de la dénervation.

Les atteintes observées sur le muscle squelettique font de ce dernier une cible thérapeutique possible. Un des moyens pour induire la stimulation musculaire et permettre une amélioration dans la pathologie serait l'exercice physique.





### 6. L'exercice physique

L'exercice physique est connu pour avoir des bienfaits sur l'organisme au niveau de métabolisme énergétique, du bien-être, améliorant ainsi la qualité de vie corporelle et intellectuelle.

D'autre part, la stimulation électrique due aux contractions permet une stimulation plus importante des unités motrices, avec une réadaptation du métabolisme énergétique des cellules concernées.

Au vue de la littérature, la SLA présente, aussi bien dans la pathologie humaine que dans les modèles animaux, des faiblesses musculaires, des défauts du métabolisme et une activité physique amoindrie.

L'exercice physique est actuellement conseillé dans de nombreuses maladies neurodégénératives, telles qu'Alzheimer ou Parkinson, (McCrate and Kaspar, 2008), permettant une amélioration de l'état de santé des patients due aux stimulations intenses des unités motrices.

# 1.L'exercice physique dans les maladies neurodégénératives

L'exercice physique semble donc être une potentielle voie de traitement en permettant la stimulation musculaire et l'augmentation du métabolisme énergétique.

De nombreuses études ont montré une relation entre une activité physique soutenue et le déclenchement de la SLA (Harwood et al., 2009; Longstreth et al., 1991). Ainsi l'incidence de la SLA serait plus élevée (environ 50 fois) chez les footballeurs américains (Abel, 2007) ou italiens (Taioli, 2007) avec une apparition plus précoce des symptômes. Cependant, des facteurs toxiques pourraient être un second facteur déclenchant, telles que les cyanobactéries présentes sur les pelouses des stades italiens, et pourraient être en partie responsables de l'augmentation de l'incidence (Stipa et al., 2006). De plus, l'utilisation de substances





dopantes dans les milieux sportifs constituerait un facteur de risque de développer la SLA (Beretta et al., 2003).

Dans le cas de la SLA, les micros lésions musculaires, lors des exercices physiques, pourraient fragiliser les fibres et les rendraient plus sensibles à la SLA. Au niveau des motoneurones, l'activation électrique de manière excessive pourrait augmenter le sodium cytoplasmique et engendrer une augmentation du phénomène d'excitotoxicité glutamatergique (Kiernan, 2009). D'autre part, certains gènes, connus pour être régulés durant l'exercice physique, sont des gènes associés au développement de la SLA (Bray, 2000), notamment le gène SOD1 permettant la détoxification des cellules.

Cependant, en 2005 de nouvelles études épidémiologiques montrent une absence de corrélation entre exercices physiques et déclenchement de la SLA (Valenti et al., 2005; Veldink et al., 2005), mais l'utilisation de l'exercice physique comme traitement palliatif est considérée comme néfaste pour les patients SLA (Harwood et al., 2009), cela induirait potentiellement une augmentation du stress oxydant, l'une des raisons invoquées dans la mort cellulaire des MN dans la SLA.

L'ensemble de ces données suggère un effet délétère de l'exercice physique dans le cadre de la SLA (Chen et al., 2008; Lisle and Tennison, 2015).

# 2.Adaptations physiologiques à l'exercice physique

L'exercice physique peut être caractérisé par son type de contraction (isométrique, concentrique...), sa durée, sa fréquence, son intensité et l'environnement (par exemple la modulation du taux de dioxygène suivant l'altitude change les caractéristiques d'un exercice). Les exercices peuvent être classés suivant le type d'activité (endurance ou résistance) et le niveau (faible, modéré, intense).

Cependant, malgré un même type d'exercice physique et un même niveau, la réponse de l'organisme va être variable d'un individu à l'autre, car elle dépend





partiellement des capacités intrinsèques de l'individu, et de la répartition des différents types de fibres des unités motrices utilisées (Bray, 2000).

#### 1. Plasticité du muscle à l'exercice physique

La contraction musculaire induit de nombreuses modulations au sein du muscle pour permettre à ce dernier de s'adapter à la charge de travail. Suivant le type de stimulation nerveuse, d'exercice, de contraintes mécaniques, d'intensité ou de réponse hormonale, la typologie et le métabolisme énergétique vont évoluer changeant ainsi la structure du muscle (Roy and Marette, 1996). Ces modifications vont dépendre de la composition initiale du muscle et de sa répartition en fibres lentes/fibres rapides (Pette and Staron, 2000). Une session d'exercice unique suffit à changer l'expression de gènes impliqués dans les fonctions cellulaires, induisant ainsi des modulations musculaires dès la première séance (McKenzie and Goldfarb, 2007).

#### 1. Modulation de la typologie musculaire

Les études des effets de l'exercice physique sur la typologie musculaire ont permis de mettre en évidence des adaptations de la typologie musculaire (Pette and Staron, 2000). La stimulation nerveuse permet une modulation des flux calciques et la libération d'Ach au niveau de la JNM. Une libération de Ca<sup>2+</sup> au niveau du RE permet l'activation de gènes tels que NFAT (nuclear factor of activated T cells), ou l'activation de facteurs myogéniques tels que MYOD, MRF4 (myogenic regulatory factor type 4), myogenin, MYF5 (Siu et al., 2004) régulant ainsi l'expression des différents types de myosine. Les concentrations des différents facteurs myogéniques sont impliquées dans l'expression de la typologie musculaire lente ou rapide (Hughes 1993) et, dans l'augmentation des capacités oxydatives du muscle (Miller, 1991) en réponse à l'entraînement.





#### Exercice d'endurance

L'exercice d'endurance est caractérisé par une augmentation de la proportion de fibres lentes et de la vascularisation des muscles locomoteurs (Salmons and Vrbová, 1969). Une augmentation de la densité mitochondriale est observée induisant une augmentation de consommation d'oxygène. La transition des fibres rapides glycolytiques en fibres-IIa, plus oxydatives, est possible par la modulation du métabolisme énergétique (Schluter and Fitts, 1994), de la variation de l'expression des MyHC et de la surexpression de gènes tels que PPAR (peroxysome proliferator activated receptor) ou PGC1 $\alpha$  (PPAR gamma coactivateur-1 alpha) (Lin et al., 2002; Russell et al., 2003). PGC1 $\alpha$  active l'expression de certaines enzymes de la chaîne respiratoire, module la phosphorylation oxydative par régulation des gènes Oxphos et UCP (uncoupling protein) (Puigserver and Spiegelman, 2003). L'ensemble de ces modulations permet d'accroître la résistance à la fatigue lors de hautes fréquences de stimulations nerveuses sur un temps relativement long.

#### Exercice de résistance

L'exercice de résistance augmente la proportion des fibres rapides par une stimulation des cellules satellites. Il permet aussi un accroissement de la surface induisant l'hypertrophie musculaire facilement observable lors d'exercices de musculation (Dudley, 1988; Mikesky et al., 1991). Une diminution de la densité mitochondriale est observée, amenant ainsi le muscle dans un métabolisme plus anaérobie. L'expression de facteurs myogéniques est, elle aussi modulée (Hoppeler and Fluck, 2003) et c'est la sous-unité b de PGC1α qui est activée (Yoshioka et al., 2009), permettant l'adaptation du muscle aux stimulations nerveuses de plus forte intensité mais sur un temps plus restreint.

#### 2. Modulation due au stress mécanique

Un exercice physique peut induire de micros lésions musculaires engendrant des processus inflammatoires (Clarkson, 1992; Jones et al., 1986; Kuipers, 1994). Ces micros lésions sont des ruptures de la membrane plasmique. Une augmentation





de protéine musculaire dans le sang et un accroissement du taux de Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique dans les cellules musculaires, induisent la mise en place de processus régénératifs avec activation des cellules satellites et augmentation de facteurs trophiques (Bamman et al., 2004) et myogéniques (Ferraiuolo et al., 2009). Durant l'inflammation, la sécrétion de certaines myokines est augmentée, activant ainsi le recrutement des cellules du système immunitaire dont leur origine, musculaire ou sanguine, reste à déterminer (Arnold et al., 2011). Des adaptations du profil génique des muscles squelettiques permettent la surexpression des gènes codant pour les protéines de choc thermique (HSP), facilitant la réparation des micros lésions (Morton et al., 2009). Ces adaptations se produisent pendant l'exercice et certaines durent pendant plusieurs heures permettant une protection contre de nouveaux dommages cellulaires.

#### 2. Adaptation au stress oxydant

L'exercice physique génère un stress oxydant, en produisant des ROS dont la concentration dépend de l'intensité et du type d'exercice physique (Gomez-Cabrera et al., 2009). Un type d'exercice d'endurance, tel que la course, utilise préférentiellement un métabolisme oxydatif et engendrera une production massive de ROS (Davies and White, 1982). L'ensemble des mécanismes antioxydants seront donc activés (Banerjee et al., 2003; Gomez-Cabrera et al., 2009), permettant une adaptation physiologique à l'exercice. A l'issu d'un exercice physique, il a été montré que le taux de radical hydroxyle est diminué dans le sang (Itoh et al., 1998) et que les entraînements réguliers permettent d'améliorer la résistance des muscles au stress oxydant (Radak et al., 2002).

Une des voies utilisées, pour permettre la régulation des ROS est la modulation du facteur de transcription PGC1 $\alpha$  par la voie Ca<sup>2+</sup>/calmoduline (Tiraby and Langin, 2005). PGC1 $\alpha$  intervient dans la régulation de la biogenèse des mitochondries, il est donc largement exprimé dans les muscles préférentiellement oxydatifs avec une plus forte proportion de fibres lentes. L'expression de PGC1 $\alpha$  augmenterait en parallèle de l'intensité de l'exercice physique (Stepto et al., 2012) et





serait directement corrélé à l'activation d'AMPK, un puissant modulateur du métabolisme énergétique (Egan et al., 2010).

#### 3. Adaptation du métabolisme énergétique

#### 1. Régulation hormonale

#### La leptine

La leptine est une hormone sécrétée par le tissu adipeux blanc, l'estomac et les muscles. Elle active les voies anorexigènes et inhibe les voies orexigènes, cela induit un phénomène de satiété et diminue la prise alimentaire (Misra and Garg, 1996). Ce sont les cellules adipeuses qui produisent le plus de leptine, ainsi elle est modulée par la variation des réserves de graisse, et participe au contrôle de la glycémie. En effet elle diminue la sécrétion d'insuline, active AMPK induisant ainsi de nombreuses modulations (Richter and Ruderman, 2009). Les plus notables sont une augmentation de la température corporelle par activation des UCP, et induction préférentielle de la béta oxydation dans le muscle squelettique.

Suivant le type d'exercice physique, le taux de leptine est modulé (Essig et al., 2000; Karamouzis et al., 2002). Lors d'un exercice de résistance intense, il est diminué, activant la prise alimentaire pour permettre la restitution des ressources énergétiques. Lors d'un exercice d'endurance, il est augmenté, augmentant la thermogenèse (Gomez-Merino et al., 2002) et optimisant la consommation d'oxygène. Cependant une augmentation du taux de leptine empêche l'hypothermie, processus favorisant la récupération, protégeant les neurones de la mort cellulaire et diminuant le stress oxydant.

#### IGF-1 ; insulin growth factor 1

L'IGF-1 est un facteur de croissance peptidique de structure proche de l'insuline. Il est majoritairement sécrété par le foie mais les cellules gliales, les cellules musculaires et les cellules tumorales peuvent en produire en faible quantité (Laron, 2001). L'IGF-1 régit les mécanismes de contrôle du métabolisme cellulaire et





influence la balance énergétique (Chitnis et al., 2008). Il stimule directement l'homéostasie du glucose au même titre que l'insuline. La fixation de l'IGF-1 à son récepteur permet l'activation de trois voies de signalisation, PI3K/Akt, ERK et JAK/STAT (Chitnis et al., 2008). Cela lui confère un rôle neuromodulateur dans la formation des JNM à l'âge adulte (Bilic et al., 2006; Ozdinler and Macklis, 2006). Il intervient aussi au niveau de la réponse inflammatoire lors du recrutement des cellules gliales et leur prolifération (De Paula et al., 2014). Enfin, via la voie PI3K/Akt, il stimule la prolifération et différentiation des cellules musculaires ainsi que l'utilisation du glucose via la fermentation lactique (Chin et al., 2009).

Lors d'un exercice physique, l'expression d'IGF-1 est fortement stimulée. Ce dernier est l'un des médiateurs les plus importants dans les bénéfices d'un exercice physique à plus ou moins long terme (Suikkari et al., 1989). La signalisation intracellulaire d'IGF-1 induit un effet neuroprotecteur aussi bien au niveau des motoneurones que du système nerveux central (Carro et al., 2001). L'expression d'IGF-1 avec l'exercice physique serait lui-aussi dépendant de l'intensité (Llorens-Martín et al., 2010; Trejo et al., 2008).

#### **2. AMPK**

L'AMPK se trouve activé dans de nombreux cas : la contraction musculaire ainsi que la leptine sont deux de ces stimuli activateurs (Tosca et al., 2008). Durant l'exercice physique, la consommation d'énergie module le ratio AMP/ATP, ce qui active AMPK aussi bien chez l'homme que chez le rongeur (Narbonne and Roy, 2009). Cette activation favorise la glycolyse, la béta-oxydation et ralentit les voies consommatrices d'ATP telles que la synthèse de protéines.

L'intensité et le type d'exercice peuvent moduler les ressources énergétiques utilisées, qui sont directement liées à l'état de phosphorylation d'AMPK. Dans le cas d'un exercice d'intensité modérée, les fibres musculaires sollicitées stimulent AMPK au niveau de sa sous-unité α2 (Chen et al., 2003), ce qui a pour conséquence une sécrétion de catécholamines activant la lipolyse des triglycérides (Duncan et al., 2007). Les AG libérés dans le sang permettent un rétablissement de l'homéostasie énergétique. Dans le cas d'un exercice de plus forte intensité, une adaptation des





isoformes de myosine permettra l'utilisation préférentielle d'un métabolisme glycolytique (Chen et al., 2003).

#### 4. Autophagie et exercice physique

L'exercice physique est reconnu pour activer l'autophagie (Dagon et al., 2015; He et al., 2012; Smiles et al., 2015; Ulbricht et al., 2015). Plusieurs voies d'activation ont été démontrées, ainsi He et collaborateurs suggèrent une activation de l'autophagie par l'exercice physique, via la disruption du complexe BCL2/Beclin1. En effet, les protéines anti-apoptotiques, de la famille de BCL2 (B-cell lymphoma), peuvent interagir avec la protéine Beclin1 qui intervient dans l'initiation de l'autophagie. Lors de la dissociation du complexe BCL2/Beclin1, Beclin1 est libre d'interagir avec PI3K et ainsi stimuler l'autophagie (He et al., 2012). Une autre étude suggère l'activation de l'autophagie par phosphorylation d'AMPK stimulant l'initiation par phosphorylation d'ULK1/2 (Schwalm et al., 2015).

Lors d'un phénomène de jeûne, l'autophagie est augmentée, pour permettre de répondre aux besoins cellulaires. Jamart et collaborateurs montrent une augmentation de l'autophagie plus importante lors d'un exercice à jeun (Jamart et al., 2013). Ces données suggèrent que, l'exercice physique active l'autophagie par un processus différent de celui de la carence alimentaire.

### 3. L'exercice physique dans la SLA

L'exercice physique a un rôle préventif dans les maladies cardiovasculaires, permet une amélioration de la neurogenèse adulte et joue un rôle dans l'amélioration du système immunitaire (Kruk, 2009).

Dans des contextes neurodégénératifs, l'exercice physique réduirait les troubles neurologiques et diminuerait la neurodégénérescence. Il serait aussi une méthode efficace pour la récupération des fonctions motrices. Ces améliorations ont pu être démontrées sur un modèle souris ayant subi une lésion de la moelle épinière, un exercice de marche volontaire en roue a permis le rétablissement des fonctions motrices et de la régénération du nerf sciatique (Engesser-Cesar et al., 2005).



L'utilisation de l'exercice physique dans des modèles souris de maladie neurodégénérative a montré des résultats encourageants sur les modèles souris de neuropathie motrice progressive (Ferrer-Alcon et al., 2008), sur la maladie d'Alzheimer (Adlard et al., 2005), d'Huntington (Pang et al., 2006) et de Parkinson (Fischer et al., 2004).

PARIS DESCARTES

Dans notre laboratoire, des exercices physiques adaptés (roue motorisée) pour l'amyotrophie spinale infantile (SMA) ont été mis en place. Les résultats sur un modèle murin de SMA ont montré une amélioration de la durée de vie des souriceaux, une augmentation de la force motrice et de l'activité spontanée (Grondard et al., 2005).

Malgré le grand nombre d'études réalisées sur les modèles murins ou sur les patients, les effets de l'exercice physique dans la SLA restent soumis à controverse.

### 1. Programme d'exercice physique chez les patients SLA

La stimulation motrice des patients par des exercices adaptés n'a pas permis de mettre en évidence un apport notifiable sur la qualité de vie, la fatigue ou la force musculaire (Bello-Haas et al., 2007; Drory et al., 2001; Patel and Hamadeh, 2009). Une stimulation des muscles respiratoires a permis une amélioration significative des fonctions respiratoires (Cheah et al., 2009; Pinto et al., 1999).

#### 2. Exercice physique et modèle murin

Les expériences d'exercice physique sur les modèles souris SLA montrent des résultats contradictoires. D'une part, un entraînement en course forcée sur tapis roulant montre des effets bénéfiques sur l'évolution de la pathologie ou la durée de vie, suivant le sexe de l'animal et le modèle souris (Kirkinezos et al., 2003; Veldink et al., 2005). D'autre part un exercice, avec augmentation progressive de la vitesse, montre une accélération du développement de la pathologie (Mahoney et al., 2004).



Dans le cas d'un exercice volontaire sur roue non motorisée, un ralentissement de la pathologie et une amélioration des capacités motrices sont observables (Kaspar et al., 2005). Le nombre d'heures de disponibilité de la roue est un facteur évolutif dans ce protocole. L'amélioration des symptômes est corrélée au temps d'accès à la roue. Ainsi l'exercice de course doit être suffisamment long pour avoir un effet significatif sur la pathologie.

PARIS DESCARTES

La neuroprotection induite par l'exercice de course ne serait que transitoire. En effet le nombre de motoneurones spinaux est significativement plus important vers P90 dans des souris SLA entraînées (Carreras et al., 2010). Tandis qu'en fin de vie, vers P120, il n'y a plus de différence sur le nombre de motoneurones entre souris SLA sédentaires et entraînées.

Dans la SLA, les patients présentent d'une part un taux d'IGF-1 relativement bas (Bilic et al., 2006; Torres-Aleman et al., 1998), et d'autre part une augmentation de l'expression des récepteurs à l'IGF-1 (Adem et al., 1994). Ces mêmes observations ont été retrouvées dans les modèles murins de SLA (Wilczak et al., 2003). Des traitements, à base d'injection d'IGF-1, ont permis un maintien des fonctions motrices et une augmentation de la durée de vie (Nagano et al., 2005; Narai et al., 2005). L'injection intramusculaire de vecteurs permettant la surexpression de l'IGF-1, dans un modèle souris SOD1(G93A), montre une action synergique de l'exercice physique et d'IGF-1. Cela a permis de mettre en évidence que la neuroprotection due à l'exercice physique était indépendante du taux d'IGF-1 (Kaspar et al., 2005).

### 3. Effets différents de l'exercice de nage et l'exercice de course

Au laboratoire, une caractérisation des effets de l'exercice physique a été mise en place sur un modèle murin SOD1(G93A) (Deforges et al., 2009). Les effets d'un exercice de course ont été comparés aux effets d'un exercice de nage.

L'exercice de course, de faible intensité et d'amplitude, se rapproche d'un exercice d'endurance (Grondard et al., 2008).



L'exercice de nage à contre-courant, de forte intensité et d'amplitude, se rapproche d'un exercice de résistance, induisant une augmentation de la fermentation lactique (Grondard et al., 2008)

PARIS DESCARTES

Ces expériences ont permis de conclure à l'amélioration de l'état général des souris après un exercice de nage avec un maintien du poids, des capacités motrices et une augmentation de la durée de vie. Cet exercice stimule préférentiellement les unités motrices FF, en activant les motoneurones de larges surfaces, cibles sensibles de la SLA. L'étude de la moelle épinière montre un maintien relatif du nombre de motoneurones par rapport aux SLA sédentaires et SLA entraînées à la course. Une diminution de l'apoptose et de l'atrophie musculaire, un maintien des JNM, et une réorganisation des types de fibres musculaires, sont autant de paramètres permettant de conclure à l'aspect bénéfique d'un exercice de nage.

Or, l'exercice de nage est un exercice de forte intensité, ces résultats sont donc en contradiction avec l'hypothèse selon laquelle, un exercice d'intensité modéré serait bénéfique tandis qu'un exercice de forte intensité serait délétère (Mahoney et al., 2004).

Ainsi deux hypothèses peuvent prévaloir sur l'utilisation de l'exercice dans la SLA. La première serait une accélération de la pathologie avec l'augmentation du stress oxydant, ce qui rendrait les cellules plus sensibles et la mort motoneuronale inévitable. La seconde serait une adaptation progressive de l'organisme permettant une meilleure gestion des radicaux libres et une utilisation optimisée des ressources énergétiques limitant ainsi la progression de la pathologie.



















### 7. Problématique

Il est reconnu que l'exercice physique, pratiqué par un individu sain, est bénéfique (Kavanagh, 1983; Pacy et al., 1986; Ritland, 1988) Une augmentation des capacités cognitives et physiques a permis aux chercheurs d'envisager l'exercice physique comme une thérapeutique possible dans les maladies neurodégénératives. Ainsi, dans les modèles murins, de nombreuses études ont été réalisées sur les maladies d'Alzeihmer, de Parkinson (Goodwin et al., 2008; Hamer and Chida, 2009), ou d'amyotrophie spinale infantile (Grondard et al., 2005) et montrent, généralement, l'apport bénéfique de l'exercice physique dans un contexte pathologique.

Dans la situation actuelle des recherches sur la SLA, les données sur l'exercice physique sont controversées. Des études épidémiologiques mettent en évidence une augmentation de la prévalence de la SLA chez les sportifs de haut niveau (Beghi et al., 2006; Chio et al., 2009; Gotkine et al., 2014). A l'inverse de certaines autres maladies neurodégénératives, l'exercice physique ne semble pas être, ici, bénéfique.

Cependant les atteintes métaboliques des patients, telles que l'intolérance au glucose, l'hypermétabolisme lipidique, et la résistance à l'insuline (Pradat et al., 2010), sont des symptômes traités par l'exercice physique dans une autre maladie telle que le diabète (Jette, 1984; Yardley et al., 2013).

Les études sur l'exercice physiques, réalisées chez les patients ne montrent pas d'amélioration des symptômes (Pinto et al., 1999), exceptée une qui, par une stimulation des muscles respiratoires, améliore la durée de vie et les fonctions respiratoires (Cheah et al., 2009). Ainsi, suivant les muscles stimulés, l'exercice physique peut, malgré tout, être bénéfique.

En parallèle, des chercheurs ont réalisés des exercices physiques sur des modèles murins. Les résultats divergent suivant les études et les types de stimulation. En 2004, Mahoney et collaborateurs, mettent en évidence un effet





différentiel de l'exercice physique suivant l'intensité pratiquée (Mahoney et al.,

2004). Un exercice de course à faible intensité semble bénéfique, alors que le même exercice à forte intensité semble délétère. Cependant d'autres équipes montrent un effet bénéfique de l'exercice de course (Kaspar et al., 2005; Kirkinezos et al., 2003) mais la notion d'intensité n'est pas étudiée. En 2009, le laboratoire publie des travaux mettant en opposition deux types d'exercice distincts, aussi bien sur l'intensité que sur le métabolisme utilisé. Un exercice de course d'intensité modérée, stimule préférentiellement un métabolisme oxydatif, tandis qu'un exercice de nage de forte intensité stimule préférentiellement un métabolisme glycolytique anaérobie (Deforges et al., 2009). Les résultats mettent en évidence les bénéfices de l'exercice de nage, induisant une neuroprotection et une amélioration de l'état général des souris (poids, durée de vie, capacités motrices...). Ce résultat va à l'encontre de l'hypothèse de Mahoney et collaborateurs, sur l'effet délétère d'un exercice physique de forte intensité. Les données suggèrent que, suivant le type d'exercice physique, la stimulation musculaire et nerveuse varie, et qu'elle peut être à l'origine d'un effet bénéfique dans l'exercice physique.

Les modulations induites par l'exercice physique sont aussi bien musculaires que métaboliques et les effets d'un exercice physique sont observables dès le premier entraînement (McKenzie and Goldfarb, 2007).

Cependant aucune étude ne s'est intéressée à l'adaptation du métabolisme énergétique due à l'exercice physique dans un modèle souris de SLA. Des études ont été réalisées sur le métabolisme énergétique des souris SLA. En accord avec les observations faites chez les patients (Piquet, 2006), les modèles souris présentent un hypermétabolisme lipidique et une altération du métabolisme énergétique (Dupuis et al., 2004; Fergani et al., 2007; Palamiuc et al., 2015). Une équipe a montré que la modulation pharmacologique PDH, par inhibition de la PDK4, améliore la durée de vie des souris SLA (Palamiuc et al., 2015)

L'exercice physique semble, dans certaines conditions, être bénéfique aux souris SLA, et l'amélioration du métabolisme énergétique par traitement pharmacologique améliore l'état de santé des souris. Afin de comprendre le lien entre l'origine de la neuroprotection induite par l'exercice de nage et l'amélioration du métabolisme énergétique, nous avons étudié, sur un modèle souris SOD1(G93A), deux exercices physiques aux caractéristiques métaboliques différentes.



L'exercice physique intervient aussi dans l'activation de l'autophagie (He et al., 2012). L'utilisation de drogues, inhibant l'étape de fusion au lysosome ou de dégradation, et l'analyse des cibles de la protéine AMPK, a permis d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes bénéfiques stimulés lors de l'exercice de nage.

PARIS DESCARTES

Pour l'ensemble de ma thèse, les études ont été réalisées sur un modèle souris SOD1(G93A). Ce modèle a été utilisé lors de la précédente thèse « Analyse des effets de l'exercice physique dans un modèle murin de Sclérose Latérale Amyotrophique » (Deforges et al., 2009) qui a mis en évidence les améliorations spécifiques à l'exercice de nage. Seuls les mâles ayant un nombre suffisant de copies du transgène ont été utilisés, permettant ainsi de standardiser l'apparition et l'évolution des symptômes.











## ésulats









# 8. Article : Specific exercise can efficiently reverse the metabolic switch affecting skeletal muscles in ALS mice.

Céline Desseille<sup>1,\*</sup>, Séverine Deforges<sup>1,2,\*</sup>, Olivier Biondi<sup>1</sup>, Antonin Lamazière<sup>3</sup>, Gaëlle Bruneteau<sup>4</sup>, Laure Weill<sup>1</sup>, Céline Oury<sup>1</sup>, Jean Bastin<sup>1</sup>, Fatima Djouadi<sup>1</sup>, François Salachas<sup>4</sup>, Claude Pariset<sup>1</sup>, Philippe Lopes<sup>1,5</sup>, Christophe Chanoine<sup>1</sup>, Charbel Massaad<sup>1</sup> & Frédéric Charbonnier<sup>1,#</sup>.




# **1.Introduction article**

La SLA, comme vue précédemment, se divise en deux grandes catégories : SLAf et SLAs. Cependant, l'ensemble des études sur les patients ont mis en évidence des atteintes métaboliques dans les deux cas (Bouteloup et al., 2009; Desport et al., 2001; Dupuis et al., 2011; Lindauer et al., 2013; Pradat et al., 2010). L'hypermétabolisme d'origine musculaire (Dupuis et al., 2004), l'intolérance au glucose et à l'insuline (Poulton and Rossi, 1993; Pradat et al., 2010) et la diminution des réserves lipidiques (Fergani et al., 2007; Pradat et al., 2010) sont décrites chez un grand nombre de patients. Une amélioration du métabolisme lipidique en phase symptomatique, sans soigner la pathologie, pourrait permettre une amélioration de l'état de santé et augmenter la durée de vie des patients. Ainsi, il a pu être montré qu'une augmentation de la quantité de lipides dans l'alimentation quotidienne permet une amélioration de l'état de santé des patients (Dupuis et al., 2004). Les mécanismes moléculaires, à l'origine des défauts métaboliques dans la SLA, sont encore mal compris. Cependant, une récente étude rapporte une augmentation de l'expression de PDK4. L'inhibition de la PDH par une augmentation de la phosphorylation et la diminution de l'expression de la PFK, suggèrent une diminution de l'utilisation du glucose dans les souirs SOD1(G86R) (Palamiuc et al., 2015). Une inhibition pharmacologique de PDK4 permet une augmentation de l'activité de la PDH et une réutilisation du glucose. La durée de vie de ces souris est augmentée d'une dizaine de jours, et la dégénérescence des motoneurones est diminuée (Palamiuc et al., 2015).

Dans la SLA, les effets de l'exercice restent controversés (Harwood et al., 2009; Pupillo et al., 2014). Selon le type d'exercice physique pratiqué, le métabolisme utilisé par les muscles varie. Dans le laboratoire, les effets d'un exercice de course et d'un exercice de nage à contre-courant ont été comparés sur le modèle murin SOD1(G93A) (Deforges et al., 2009). Les résultats ont montré une augmentation de la durée de vie et une neuroprotection à la suite du protocole d'exercice de nage et pas de course. On peut penser que ces deux types d'exercices vont stimuler des voies métaboliques différentes.

De plus, il a été récemment décrit une autophagie spécifique activée par l'exercice physique dans le muscle (He et al., 2012). Cependant, l'activation de





l'autophagie par l'exercice physique dans le muscle de souris SLA n'a pas encore été exploitée. Ainsi, le protocole utilisé permettrait une stimulation de l'autophagie, processus métabolique faisant défaut dans la SLA (Lee et al., 2015).

Dans cette étude, nous avons donc soumis, aux souris SOD1(G93A), deux types d'exercice physique : un exercice de course de faible intensité, gravitaire et d'endurance, et un exercice de nage, de forte intensité, antigravitaire et de résistance. Nous avons regardé, d'une part, les différents mécanismes mis en place dans l'un ou l'autre exercice, d'autre part, nous avons observé les effets des exercices physiques, sur les adaptations du métabolisme énergétique dans le muscle et enfin nous nous sommes intéressés au lien entre l'autophagie et exercice de nage.

L'ensemble de ces données a permis d'entrevoir une possible issue, non invasive, dans la modulation du métabolisme énergétique.





Specific exercise can efficiently reverse the metabolic switch affecting skeletal muscles in ALS mice.

Céline Desseille<sup>1,\*</sup>, Séverine Deforges<sup>1,2,\*</sup>, Olivier Biondi<sup>1</sup>, Antonin Lamazière<sup>3</sup>, Gaëlle Bruneteau<sup>4</sup>, Laure Weill<sup>1</sup>, Céline Oury<sup>1</sup>, Jean Bastin<sup>1</sup>, Fatima Djouadi<sup>1</sup>, François Salachas<sup>4</sup>, Claude Pariset<sup>1</sup>, Philippe Lopes<sup>1,5</sup>, Christophe Chanoine<sup>1</sup>, Charbel Massaad<sup>1</sup> & Frédéric Charbonnier<sup>1,#</sup>.

1 : Université Paris Descartes, INSERM UMRS 1124, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France. Tel.: 33-1-4286-2153 Fax: 33-1-4286-2119.

2 : present adress : Université Bordeaux 2, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, UMR 5297 CNRS, 146 rue léo saignat, F-33170 Bordeaux cedex

3 : Université Paris 6, Laboratoire de lipidomique, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie - Hôpital Saint-Antoine, 27 rue de Chaligny 75571 PARIS CEDEX 12, France

4 : Hôpital de la Salpêtrière, Département des Maladies du Système Nerveux, Equipe Neurogénétique et Physiologie, Institut du Cerveau et de la Moelle, 47-83 Bd de l'Hôpital 75013 PARIS, France

5 : Université d'Evry-val-d'Essonne, Bd François Mitterrand, 91000 Evry, France.

\* Contribute equally to the work

#To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-4286-2153

Fax: 33-1-4286-2119; E-mail: frederic.charbonnier@parisdescartes.fr





### ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank B. Gasnier (UMR 8250 CNRS-Paris Descartes university, France), L. Dupuis and J-P. Loeffler (University of Strasbourg, France) for fruitful discussions and advices, C. Forest, S. Bortoli and C. Benelli (UMR\_S1124 IINSERM-Paris Descartes university, France) for help in metabolic analysis, Thomas Simonet (ENS Lyon, France) for mRNA of human samples, and C. Mader (Paris Descartes university, France) for animal care.





#### Abstract

Growing evidences support a role of the energetic metabolism, and most specifically the glucose metabolism, in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In the present study, using SOD1(G93A) ALS mice and muscles biopsies from ALS patients, we questioned whether specific exercise training could reverse energetic metabolism towards the preferential use of glucose. We provide evidence that, in contrast of an endurance running-based training, a high intensity and amplitude swimming-based training was able to significantly reduce glucose intolerance and to enhance fat storage in adipose tissue in ALS mice. These benefits correlated with the restoration, dependent of the exercise-induced autophagy, of the unexpected ALS-induced alteration of GLUT4 and GAPDH expression patterns in trained ALS muscles. Furthermore, only the swimming-based training proved to be able to alter the metabolic routes in the ALS-sensible fast-twitch tibialis muscle, independently of pyruvate dehydrogenase modulation. Most importantly, the swimming-based training induced an important triglyceride accumulation in ALS tibialis, likely resulting from an increase in the expression levels of lipid transporters and of lipogenic enzymes, notably DGAT1 and related proteins. Thus, in this study, we provide the first molecular basis for the beneficial effects of specific exercise in an ALS context, which, in addition, might open a promising way to synergize the benefits induced by PDH modulation for alleviating ALS symptoms.





#### Introduction

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), the most widespread adult-onset motorneuron disease, is a chronic neurodegenerative affection characterized by a progressive motor weakness originating from the selective loss of motor neurons. Death typically occurs within three years of onset, usually from respiratory failure (Al-Chalabi and Hardiman, 2013). Riluzole, the only currently available drug extends survival by approximately three months (Lacomblez et al., 1996), thus pointing out the essential need for developing new therapeutic strategies. In approximately 85-90% of cases, ALS is sporadic (sALS). The 10-15% of remaining cases, referred to as familial ALS (fALS), are characterized by the frequent (20% of the cases) occurrence of mutations in superoxide dismutase 1 (SOD1) gene (Rosen et al., 1993) , leading to the development of mouse models of ALS based on the overexpression of human mutated SOD1 (mSOD1) transgenes (Gurney et al., 1994). The clinical and morphological abnormalities are identical in sALS and fALS, suggesting the disruption of similar mechanisms. Although the precise identity of ALS-triggered degeneration mechanisms are still elusive, growing evidence pointed out a causal role of alterations of the metabolic status (Bouteloup et al., 2009; Desport et al., 2001; Dupuis et al., 2011; Lindauer et al., 2013; Pradat et al., 2010) thought to mainly derive from skeletal muscle hypermetabolism (Dupuis et al., 2004). Indeed, a significant number of ALS patients are glucose intolerant (Poulton and Rossi, 1993; Pradat et al., 2010), and abnormalities in the lipid metabolism, notably a dramatic increase in lipolysis, are now considered as hallmarks of ALS (Dupuis et al., 2004; Fergani et al., 2007; Pradat et al., 2010). This metabolic shift might explain why fasttwitch myofibers, which preferentially use the anaerobic catabolism of glucose, are preferential targets of the disease in comparison, with slow-twitch myofibers that can





use the aerobic catabolism of lipids (Frey et al., 2000; Hegedus et al., 2008).

Pioneering the investigation of ALS-induced muscular metabolic defects, Palamiuc et al., (2015) have recently demonstrated that a metabolic switch towards lipid use occurred in fast-twitch muscle in pre-symptomatic SOD1(G86R) ALS mice (Palamiuc et al., 2015). This metabolic shift proved to be linked to the inhibition of the pyruvate dehydrogenase (PDH), which converts pyruvate produced by the glycolysis into acetyl-CoA, which in turn fuels the tricarboxylic acid cycle. Accordingly, the pharmacological inhibition of the pyruvate deshydrogenase kinase 4 (PDK4) by dichloroacetate (DCA) significantly reduced degeneration of the motor-neurons in SOD1(G86R) ALS mice (Palamiuc et al., 2015) and led to an average of 10-days increase in ALS mouse lifespan (Miquel et al., 2012). These results clearly suggested that modulating the skeletal muscle energetic metabolism might constitute a promising avenue for alleviating ALS symptoms.

In this context, specific physical exercises are expected to differentially shift the muscular energy metabolism either towards an oxidative pattern, notably lipidic, in case of low-intensity exercise, or towards a glycolytic metabolism, in case of high-intensity exercise (Van Loon et al., 2001; Romijn et al., 1993). Interestingly, submitting SOD1(G93A) ALS mice to a swimming-based protocol, a high intensity and amplitude exercise (Grondard et al., 2008), resulted in a remarkable increase of lifespan and neuroprotection at the level of the lumbar motor neurons (Deforges et al., 2009). By contrast, in most of the available studies, submitting mSOD1 ALS mice to different running-based trainings conferred a reduced neuroprotection (Carreras et al., 2010; Deforges et al., 2009; Kaspar et al., 2005; Kirkinezos et al., 2003; Mahoney et al., 2004). Data in humans are even more confusing, and the use of exercise in ALS patients remains highly debated (Harwood et al., 2009; Pupillo et al., 2014).





Although these controversies could result from the different characteristics of exercise, exercise impact on energetic metabolism in ALS skeletal muscle has never been investigated.

Furthermore, important metabolic effects of physical exercise, including the control of muscle glucose homeostasis and the protection against glucose intolerance, have been recently linked to the activity-dependent induction of autophagy in skeletal muscle (He et al., 2012). Importantly, the autophagic process is severely impaired in ALS nervous and muscular tissues (Galbiati et al., 2014). Yet, abnormal expression of several autophagic markers is depicted in the skeletal muscle of ALS mice (Crippa et al., 2013; Dobrowolny et al., 2008) or ALS-mimicking muscle cell cultures (Onesto et al., 2011) and, very recently, it has been described that the autophagic activity is compromised in the skeletal muscle of ALS mice (Xiao et al., 2015). These perturbations occur in ALS muscles although aggregates of mSOD1 are unexpected (Wei et al., 2012), raising questions about 1) the origin of the autophagic impairments in ALS muscles, 2) the potential link between autophagy impairments and energetic metabolism in ALS muscle, and 3) the potential effects of an *in vivo* modulation of autophagy, following physical exercise.

In the present study, we provide the first lines of evidence indicating that physical exercise, if carefully designed, can reduce muscle metabolic defects in ALS mice, increasing glucose tolerance and lipid storage, associated with a significant improvement of the muscular autophagic flux.



Materials and methods



Mice, exercise and treatments.

Transgenic male mice with the G93A human SOD1 mutation B6SJL-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J (ALS mice) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). ALS male were crossed with wild-type B6SJL females (Janvier, Le Genest-St-Isle, France), and only males were used for this study.

ALS male were trained from 70 days of age (P70), 30 minutes a day, 5 days a week, to a running-based or swimming-based exercise as previously described (Deforges et al., 2009; Grondard et al., 2008) and until 115 days of age (P115). 18 ALS mice (Run ALS) were submitted to a running-based training on a speed-regulated treadmill (max 13 m.min<sup>-1</sup>). 18 ALS mice (Swim ALS) were submitted to a swimming-based training in an adjustable-flow swimming pool (max 5 L.min<sup>-1</sup>). These groups were compared to 29 Sedentary ALS and 20 Sedentary Control mice.

For the autophagy analysis, specific groups of ALS male at P70 were subjected to the same swimming-based exercise for 3 days. Each mice were intraperitoneally injected 1 hour before exercise with  $10\mu$ l.g<sup>-1</sup> of either choloroquine CQ at  $5\mu$ g. $\mu$ l<sup>-1</sup>, or 3-methyladenin 3-MA at  $1.5\mu$ g. $\mu$ l<sup>-1</sup>, or a placebo NaCl 0.9% solution.

The care and treatment of animals followed the national authority (Ministère de la Recherche et de la Technologie, France) guidelines for the detention, use and the ethical treatment of laboratory animals. All experimental procedures which include minimizing the number of animal used and their suffering were approved by the policies of the French Agriculture and Forestry Ministry. All the experiments using mice were performed in a blind systematic fashion so as to minimize bias.





Morphological and histological analysis.

Epididymal white adipose tissue (EAT) and liver major were dissected on anaesthetized P115 mice old, weighted and subsequently fixed overnight at +4°C in 4% paraformaldehyde (PFA) solution diluted in 0.9% saline buffer (NaCl). Tissues were dehydrated in successive bath of different concentration of ethanol. After dehydration they were incubated in butanol then in volume to volume butanol and paraffin solutions and then embedded in paraffin overnight. Parasagittals sections were cut on microtome (Stassine, Paris) at 7 µm thickness. Sections were dried and stained with hematoxylin and eosin classical protocol. Cross-section area of EAT adipocytes was measured using Image J v1.47 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Glucose tolerance test and lactate measurement.

Glucose tolerance tests were performed on 4h fasted mice at P70 and P115. Mice were intraperitoneally injected with D-glucose (Sigma-aldrich, Saint-Louis, MO, USA) at a dose of 2g.kg<sup>-1</sup>. Glucose concentration was then measured every 15 min on tail whole blood samples using a Glucotrend R analyser (Boehringer Mannheim GmbH, Germany).

Blood sample was collected from right ventricle on anesthetized mice, with 1% pentobarbital solution (6µl.g-1) diluted in 0.9% saline buffer, using a 1ml syringe mounted with a 22-gauge needle and coated with heparin (5000UI.ml-1, Pan Pharma Luitré, France), 2 hours after training. Blood sample was centrifuged (200g, 10min, +4°C) and serum was then frozen at -80°C. The serum lactate level was measured using Lactate assay kit (Biovision research, Mountain view, CA) and following manufacturer's instructions. For each mouse, 1µl of serum were incubated at +22°C





in 50µl of buffer and 50µl of reaction mix in a 96-well plate. The plate was read on the same microplate spectrophotometer at 570nm wavelength after 30min of incubation. Lactate level was given in nanomoles per microliter (nmol.µl<sup>-1</sup>).

**RT-qPCR** analysis

For human, muscle biopsy samples were obtained from 10 patients meeting the EI Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of definite, probable or possible ALS (Brooks et al., 2000). Muscle specimens were taken from the anconeus muscle for 3 patients and the deltoid muscle for 7 patients. Six subjects with histochemically normal deltoid muscle were used as controls. These subjects had undergone muscle biopsy as a diagnostic procedure and, after careful clinical and histological evaluation, had been considered free of any neuromuscular disorder. All patients provided written informed consent before muscle biopsy, according to institutional guide lines. Biopsy specimens were immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use.

For mice, all analyzed tissues were collected 2 hours after training in liquid nitrogen and RNA was extracted using TRizol reageant (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, France). For human and mice RNA, one microgramme was reverse transcribed with oligodT and using reverse transcriptase Improm II (Promega France, Charbonnières, France). Quantitative real time PCR was performed with standard protocols using SYRBGreen ROX detector in ABIPrism 7000 (ABgene, Courtaboeuf, France). Specific primers were used at 300nM (Table1). The relative amounts of cDNA in each samples were determined on the basis of the threshold cycle (Ct) for each PCR product and normalized to either *Rps26* or *RPL13* 





Ct for mouse or human samples, respectively. The analysis was made relative to respective control samples and given by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### Immunohistochemistry

Muscles from P115 mice old were frozen in cold isopentane (-80°C) and transversally cut in 10µm sections using cryostat (CM 3050S, Leica, Le Pecq France). Sections were either putted for 10min at 50°C for Glucose transporter 4 staining (GLUT4) All sections were incubated in GLUT4 blocking solution (Tris Buffer Saline (TBS), 0.1% tween, 0.1% triton and 4% donkey serum) for 30min at room temperature and then incubated with primary polyclonal rabbit anti-GLUT4 (1:50; GT41-A Alpha Diagnostic, San Antonio, USA), antibody diluted in corresponding blocking solution, overnight at +4°C. Sections were then washed and subsequently incubated with secondary polyclonal goat anti-rabbit Cy3-conjugated for GLUT4 (1:400; 111-165-144, Jackson laboratories, Baltimore, MD) antibody diluted in corresponding blocking solution for 2h at room temperature. Sections were finally washed and mounted in VECTASHIELD® mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The staining specificity was checked in control incubations performed in the absence of the primary antibody.

#### Microscopy and images analysis

Epifluorescence were detected with a CMOS camera (ORCA Flash 2.8, Hamamatsu Photonics France, Massy, France) and histological images were recorded with a RGB camera (ICC1 Zeiss, Carl Zeiss SAS, Le Pecq, France) mounted on Zeiss AxioObserver (Z1) using the ZEN 2012 software (Carl Zeiss SAS)





with 100 (10X Zeiss Plan NeoFluar NA 0.3), 200 (20X Zeiss EC-Plan-Apo NA 0.8) and 630 (63X Zeiss Plan-Apo Oil N 1.4) magnifications.

All images were analyzed using Image J v1.47 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Identical brightness, contrast, and color balance adjustments were applied to all groups. GLUT4 staining was counted in positive-fibers and characterized as full membrane-stained or not.

#### Western blots

Dissected soleus and tibialis mice muscles were frozen in liquid nitrogen and homogenized in 50µl/5mg of RIPA buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 10mM NAF, 1X Protease inhibitor [Roche, BASEL, Suisse], 1% Phosphatase inhibitor [Sigma-aldrich, Saint-Louis, MO, USA]). Protein concentration was determined in the supernatant after centrifugation (17000g, 15min, +4°C) by Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 100 µg protein samples for LC3B analysis and 40 µg protein samples for other analysis were submitted to 12.5% SDS PAGE electrophoresis (1.5 M Tris pH 8.3, 12.5% Acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.06% TEMED). The separated proteins were transferred on PVDF membranes (Biorad) and then incubated overnight at +4°C with each of the following primary antibody including polyclonal rabbit anti-PDHE1a P ser293 (1:1000; AP1062; Merck Milipore, Darmstadt, Allemagne), rabbit anti-PDHE1a (1:1000; ab110334, Abcam, Cambridge, UK), monoclonal mouse anti-LC3B (1:1000; NB100-2331, Novus Biological), mouse anti-GAPDH (1:10.000; MAB374, Milipore) and mouse anti-atubulin (1:20.000; T6074, Sigma) diluted in blocking solution. Membranes were then washed and incubated in horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody goat anti-rabbit or goat anti-mouse (1:5000; Biorad, Hercules, CA, USA). Revelation





was performed with Amersham<sup>™</sup> ECL<sup>™</sup> Western Blotting Analysis System (GE Healthcare, Bio-Science, Upsala, Sweden). Images were done using ImageQuant LS4000 (GE Healthcare Bio-Science, Upsala, Sweden) and quantification was performed using Image J v1.47 software.

Measurement of mitochondrial enzyme activities in muscle homogenates

Frozen *tibialis* from P115 mice old were weighed and mechanically homogenized in cold buffer (20mM TRIS, 250mmol sucrose, 2mM EGTA, 40mM KCl, pH 7.2; 1/25 weight/volume) using motor-driven Teflon/glass homogenizer. Homogenates were centrifuged (100g, 10 minutes, +4°C), frozen at -80°C and used for the enzyme activity within 6 months. Total protein content of homogenates was determined by the Lowry method.

Cytochrome c oxydase activity (COX) was measured at +37°C in 1ml of reaction buffer (10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25M sucrose, 1mg/ml BSA, 13.6 $\mu$ M reduced cytochrome c, and 2.4mM lauryl maltoside) as described by Barrientos (Barrientos et al., 2002). The reaction was initiated by addition of 10 $\mu$ l of muscle homogenate and changes in OD at 550nm were monitored for 3min.

Citrate synthase activity (CS) was measured at +30°C in 1ml of reaction buffer (10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM EDTA, 1mg/ml BSA, 0.1mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 0.1mM acetyl-CoA) and 10  $\mu$ l of muscle homogenate as described by Barrientos (Barrientos et al., 2002). The reaction was initiated by addition of 20mM oxaloacetic acid and changes in OD at 412nm were monitored for 5 min. For both enzymes' activities, the maximal slope in  $\Delta$ OD.min<sup>-1</sup> was recorded, normalized to the protein content and expressed as nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> of protein.





#### Lipidomic analysis

The TAG of the Bligh and Dyer extract (Bligh and Dyer, 1959) were prepared from homogenized muscles in water and separated on a normal phase PVA-Sil column (Polymerised Vinyl Alcohol silica (5µ) support ; L 250mm X ID 4mm) (YMC, Kyoto, Japan). The PVA-Sil column was fitted on a Agilent 1200 HPLC equipment coupled to the electrospray ionization (ESI) source of a triple-quadrupole mass spectrometer (API3000, ABSciex). Triacylglycerols species were quantified by integration of molecular ions (as ammonium ion adducts) from full scan mass spectra and application of standard curves that relate the responses of known amounts of reference standards to that for a single internal standard as described elsewhere (Hutchins et al., 2008).

#### Statistical analysis.

All data are presented as mean and standard deviation. For the glucose tolerance studies a one way ANOVA for repeated measures with Tukey post hoc analysis was performed on the data. For the other studies, a Kolmogorov-Smirnov normal distribution analysis was performed on all data followed by either a student's t-test for normally distributed data or a non-parametric Kruskal-Wallis test, to verify significant differences between groups (Systat v 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL). All the data presented in this study were considered as statically different when the statistical power exceed 95% (AnaStats.fr, France).



Results



The swimming-based training specifically increases adipocyte lipogenesis in ALS mice.

The ALS-induced loss of body mass detected from the asymptomatic phase of the disease in several mouse models of ALS (Dupuis et al., 2004) is differentially altered by the two exercises (Deforges et al., 2009). Indeed, unlike running, the swimming-based training significantly limited the body weight loss of ALS mice (Deforges et al., 2009). The differential effects of these two exercises on the body weight were also found in the control mice with an exercise-induced decrease of the body weight significantly higher in the running- than in the swimming-based trained control mice (Figure 1A). To determine whether the differential effects of specific exercises could be linked to the preservation of adipocyte lipogenesis, we analyzed body composition in trained and sedentary ALS and control mice at P115. We found that epididymal adipose tissue (EAT) was markedly reduced in sedentary ALS mice with a loss of 88 % compared to sedentary controls (Figure 1B-C). These data were in agreement with those previously recorded in the SOD1(G86R) ALS model (Dupuis et al., 2004). The EAT mass loss was correlated with a global reduction of the adipocyte cross-section area compared to controls (Figure 1D). At the cellular level, we recorded in sedentary ALS mice, a significant reduction in the proportion of large fat cells (cross-section area higher than 1000 µm<sup>2</sup>) whereas the proportion of small fat cells (cross-section area lower than 1000  $\mu$ m<sup>2</sup>) significantly increased (Figure 1D). Interestingly, only the swimming-based training induced a significant increase in EAT mass in ALS mice compared to their sedentary counterpart (Figure 1B, 1C). Furthermore, the two exercise paradigms differentially impacted the adipocyte size distribution. By contrast to the swimming-based training that did not alter the





adipocyte size distribution recorded in sedentary ALS, the running-based training worsened the shift of adipocyte distribution to the smaller sized population (Figure 1D).

Since defects in lipid metabolism is thought to be a major cause of liver steatosis, and is frequently recorded in ALS human patients (Dupuis et al., 2008), we analyzed the liver histology in sedentary and trained ALS and control mice at P115. Sedentary ALS mice displayed a 32% decrease of the mass of the major liver lobe compared to sedentary controls (Figure 1E), as previously reported (Finkelstein et al., 2011). No steatosis was observed in the liver of SOD1(G93A) ALS mice (Figure 1F). A comparable reduction of the liver mass was noticed in trained ALS mice either submitted to the running- or the swimming-based training.

A significant improvement in glucose tolerance is specifically induced by the swimming-based training in ALS mice.

Since the swimming-based training was relatively efficient in keeping the lipid stores at a nearly constant level in ALS mice, we questioned whether this preservation might be linked to an intrinsic change in energy metabolism. To address this question, we assessed glucose tolerance in sedentary controls and sedentary and trained ALS mice in the presymptomatic (P70) and late symptomatic (P115) phases of the disease. The results of an intraperitoneal glucose tolerance test revealed that, from P70 until death, sedentary ALS mice display a severely impaired glucose tolerance. The blood glucose levels remained over 23 mmol.L<sup>-1</sup> 1h after a 11.1 mmol.kg<sup>-1</sup> glucose injection (2 g.Kg<sup>-1</sup>), whereas in wild-type mice whole blood glucose concentration was closed to baseline levels at that time (Figure 2A-C). Most importantly, glucose tolerance in ALS mice was improved following specific training.





In swimming-based trained ALS mice, the glucose tolerance increased and reached values comparable to controls at P115 (Figure 2B). By contrast, the running-based had no effects on glucose tolerance after 45 days of training (Figure 2C).

We next wondered to evaluate the effect of the swimming-induced increase in glucose tolerance on its subsequent use as an energetic substrate in ALS mouse tissues. To this end, we measured the levels of circulating lactate in sedentary control and in sedentary and trained ALS mice at P115 in resting conditions (Figure 2D). We found as expected (Ferraiuolo et al., 2011) a significant decrease of circulating lactate levels in sedentary ALS mice, in comparison to control mice. Interestingly, unlike running, the swimming-based training induced a significant increase in the levels of circulating lactate in ALS mice, suggesting a specific-exercise-induced activation of glycolysis in ALS skeletal muscles, even in resting conditions.

Expression and distribution of GLUT4 are altered in the ALS skeletal muscle and improved by physical exercise.

Among glucose transporters, GLUT4 is the most abundant in skeletal muscle and its level of expression is a major determinant of glucose uptake by skeletal muscle fibers (Richter and Hargreaves, 2013). We used RT-qPCR to determine the relative transcripts levels for *GLUT4* in human muscle specimen (Figure 3A). We found a significant decrease of *GLUT4* mRNA expression in ALS muscles compared to controls. We then analyzed the *Glut4* expression profile in the skeletal muscles of mSOD1(G93A) mice, in the fast-twitch *tibialis*, which was early affected by the disease and in the slow-twitch *soleus*, which was spared by the disease (Hegedus et al., 2008). We found a significant decrease of *Glut4* mRNA expression in the two





muscles in ALS mice, in the late symptomatic phase of the disease (P115) (Figure 3B-C).

Since muscle glucose uptake is not only dependent of *Glut4* expression levels, but also of its abundance at the sarcolemma level, we analyzed the sub-cellular distribution of GLUT4 in the *tibialis* and *soleus* of mSOD1(G93A) mice. We found that the GLUT4 subcellular distribution is largely intracellular, throughout the cytosol, and absent of the sarcolemma in ALS *tibialis* muscles, compared to controls (Figure 3D-E). By contrast, no difference in GLUT4 subcellular distribution was observed in the *soleus* (Figure 3F-G).

Since exercise is thought to induce GLUT4 mobilization to the sarcolemma of activated myofibers, we next investigated whether exercise trainings could improve GLUT4 subcellular distribution in the ALS *tibialis*. RT-qPCR analysis of *Glut4* expression revealed that only the swimming-based training significantly increased *Glut4* expression in ALS muscle that reached levels comparable to controls (Figure 3C). When we looked at the subcellular localization of GLUT4 in the trained ALS *tibialis*, we found that, in contrast of the running-based training, the swimming-based training induced a relocalization of the transporter to the *tibialis* sarcolemma as evidenced by the decrease of GLUT4-positive intracellular vesicles and the increase of GLUT4 staining at the sarcolemmal level in trained muscles (Figure 3D-E).

Taken together, these results demonstrate that, in ALS muscles, the expression of GLUT4, the major glucose transporter in the skeletal muscle, is altered in ALS in a muscle-dependent manner, and that GLUT4 expression can be significantly improved only by the swimming-based training, concurring with our recordings of glucose tolerance in sedentary and trained ALS mice.

## UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES



GAPDH expression, altered in specific ALS skeletal muscle, is improved by physical exercise.

Since an exercise-induced improvement in GLUT4 expression associated with the improvement of the glucose tolerance might fuel glycolysis in ALS muscle, we wondered to analyze the expression pattern of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) that has long been recognized as a pivotal enzyme for the production of ATP and pyruvate from glucose through glycolysis. We investigated *GAPDH* mRNA expression in ALS human and mouse muscles by RT-qPCR. We found a significant decrease of *GAPDH* mRNA expression in human muscle specimens (Figure 4A). In the *tibialis* of ALS mice, the levels of *Gapdh* mRNA were significantly decreased compared to controls, in the late symptomatic phase of the disease (P115) (Figure 4B). This result was confirmed at the protein level at P115 (Figure 4C). The situation was more complex in the *soleus* of ALS mice, characterized by a significant decrease of *Gapdh* mRNA (albeit two-fold less than in *tibialis*) with protein levels comparable to controls (Figure 4D-E).

We next investigated whether exercise trainings could improve GAPDH expression in ALS *tibialis*, at mRNA and protein levels. Exercise trainings induced a significant increase of *Gapdh* expression in *tibialis*, albeit with different efficacy. While the running-based training resulted in a slight but significant increase of *Gapdh* mRNA, the swimming-based training induced a 4-fold increase of *Gapdh* mRNA, which reached a level superior to controls (Figure 4C). Consistently, the GAPDH protein levels closely paralleled the specific exercise-induced increase in *Gapdh* mRNA with a more important effect obtained with the swimming protocol (Figure 4 D-F).





Taken together, these data suggested that soliciting ALS muscle by highintensity exercise re-balanced the enzymatic equipment in ALS muscle, leading to the improvement of the anaerobic capacity of fast-twitch muscles.

Specific exercise-induced GLUT4 and GAPDH expression is linked to autophagy.

Autophagy, which is essential for the maintenance of cellular homeostasis, was recently shown altered in ALS muscles (Onesto et al., 2011; Dobrowolny et al., 2008; Crippa et al., 2013; Xiao et al., 2015). Among the different systems of autophagy, the exercise-inducible Beclin-1-dependent autophagic pathway has been shown to play an important role in the exercise-induced muscle adaptation of the glucose metabolism in healthy conditions, including GLUT4 relocalization to the sarcolemma and subsequent increase of glucose intake (He et al., 2012). These data prompted us to evaluate the status of this specific autophagic pathway in tibialis and soleus of ALS mice. We first evaluated the expression levels of Beclin-1, Bcl-2, Lc3b and P62 by RT-qPCR. As evidenced in Figure 5, most of the autophagic marker expressions were found altered in the skeletal muscles of ALS muscle, with a marked muscle and gene specificity. In the tibialis of sedentary ALS mice, Beclin-1, Lc3b and P62 mRNA were found significantly down-expressed when compared to controls (Figure 5A, C-D), whereas no significant change was found for *Bcl-2* expression (Figure 5B). In the soleus of sedentary ALS mice, only Beclin-1 and Bcl-2 mRNA expressions were found down-regulated, with no change for the other markers (Figure 5E,F). In the ALS tibialis, the swimming-based protocol led to a general increase in autophagic marker expression levels, including Beclin-1, Lc3b, and P62 mRNA. The running-





based training exerted more modest effects. Indeed, a significant increase in *Lc3b* mRNA expression could solely be observed (Figure 5A).

To confirm these results at the protein level, we analyzed LC3B levels by western blot in the *tibialis*. Contrasting to the mRNA expression data, we found an accumulation of the two forms of LC3B, LC3B-I and LC3B-II, the lipidated version of LC3B-I involved in autophagosome formation, in ALS *tibialis* muscles when compared to controls (Figure 5I). Since LC3B protein accumulation associated to *Lc3b* mRNA decrease might suggest an autophagic flux blockade in ALS *tibialis*, we hypothesized that physical exercise, in activating autophagy, would rebalance LC3B protein and mRNA expression. As expected, both exercise paradigms induced a decrease of LC3B-I and LC3B-II proteins, which, for the swimming-based training, reached levels comparable to controls.

We next examined whether the swimming-induced increase of GLUT4 and GAPDH expressions in the ALS *tibialis* was dependent of autophagy. We submitted a population of P70 ALS mice to a swimming-based training for 3 days with or without a blocking of lysosomal degradation by chloroquine (CQ) or the autophagosome formation by 3-methyladenin (3-MA) (Figure 5J-K). Interestingly, autophagy inhibition with CQ or 3-MA impaired the swimming-induced increase of *Glut4* and *Gapdh* mRNA expression in the trained ALS *tibialis*, suggesting a functional link between the swimming-induced autophagy flux activation and the control of metabolic gene expression in ALS *tibialis*.

Taken together, all these data suggested that an anaerobic exercise such as swimming, in inducing autophagy, improved the expression, by fast-twitch ALS muscles, of proteins that are essential for glucose uptake and use.

### UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES



The swimming-induced alterations of the metabolic routes in ALS skeletal muscles are independent of Pyruvate Dehydrogenase modulation.

Pyruvate, the by-product of the glycolysis, can be metabolized by two main ways in muscles, *i.e.* the anaerobic pathway, that will result in the production of lactate, or the aerobic pathway, that will result in the production of acetate. Thus, we next investigated the regulation of the Pyruvate Dehydrogenase (PDH) complex. which is pivotal in determining the partitioning of anaerobic compared with aerobic use of pyruvate produced by the glycolysis. The PDH E1-alpha subunit is considered as the on/off switch of the PDH complex, since its phosphorylation by the pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) in the muscle leads to PDH complex inactivation (Wu et al., 1999). Importantly, the alteration of PDK4 expression has been recently highlighted in ALS skeletal muscle (Palamiuc et al., 2015). Therefore, we analyzed the level of PDH E1-alpha phosphorylation in *tibialis* and *soleus* of ALS mice. The level of PDH E1-alpha phosphorylation was significantly higher in the tibialis from ALS mice compared to controls (Figure 6A), while no significant change was found in the soleus (Figure 6B). We next evaluated the level of Pdk4 mRNA expression by RT-qPCR. As previously found in the SOD1(G86R) ALS mouse model (Palamiuc et al., 2015), and consistently with higher PDH phosphorylation levels, ALS tibialis displayed significantly higher Pdk4 expression levels when compared to control muscles (Figure 6C), whereas no significant change was found in the soleus (Figure 6D). Interestingly, the effects of physical exercise in ALS tibialis proved to alter the PDH phosphorylation status in an exercise-type dependent manner. Indeed, the running-based training induced a significant decrease in PDH E1-alpha phosphorylation in ALS tibialis that reached levels comparable to controls (Figure 6A). Accordingly, the expression level of *Pdk4* was found significantly decreased in





the ALS *tibialis* by the running-based training when compared to sedentary ALS muscle (Figure 6C). By contrast, the swimming-based training had no effect on PDH activation pattern, nor on PDK4 expression levels, strongly suggesting that all the swimming-induced changes in ALS *tibialis* unexpectedly occurred independently of PDH modulation (Figure 6A).

Following their conversion in Acetyl-CoA by PDH, the carbohydrates are used by the tricarboxylic acid cycle to be completely oxidized. In order to evaluate the oxidative capabilities of ALS *tibialis*, we evaluated the activity levels of the citrate synthase (CS), which catalyzes the first step of the tricarboxylic acid cycle. According to a decrease of PDH activity, we found that the levels of CS enzymatic activity were significantly decreased in ALS *tibialis* compared to controls (Figure 7A). Interestingly, both exercise programs significantly increased CS activity in ALS *tibialis*.

Finally, we evaluated the activity of cytochrome-*c* oxidase (COX) as an index for respiratory chain activity in the *tibialis* of control mice and trained and sedentary ALS mice. We found a 48% decrease of COX activity in the *tibialis* of ALS mice compared to controls (Figure 7B). According with the running-induced PDH and CS activations, the running-based training induced a significant 2-fold increase of COX activity in the ALS *tibialis* in comparison to sedentary ALS muscles. Interestingly, we found that the swimming-based training also induced a 2-fold increase of COX activity in ALS *tibialis*, suggesting in absence of PDH activation but with increase of CS activity, that the swimming-based training might favor lipolysis rather than glycolysis for fueling the tricarboxylic acid cycle in ALS *tibialis*.

## UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES



The swimming-induced triglyceride accumulation in ALS tibialis is related to both fatty acid uptake and lipogenesis.

Since these results suggested that the use of fatty acids as energetic fuel could be enhanced by the swimming-based training in ALS *tibialis*, we looked at the expression profile of the two fatty acid transporters *Cd36* (Cluster of Differentiation 36) and *Vldlr* (Very Low Density Lipoprotein Receptor) by RT-qPCR. As shown on Figure 8 A,B, the levels of *Vldlr* expression were decreased in ALS but no change was observed for *Cd36* expression. As expected, the swimming-based training induced a significant increase of *Cd36* and *Vldlr* expression levels, suggesting a facilitated lipid uptake. By contrast, the running-based training had no effect (*Vldlr*) or even induced a significant decrease (*Cd36*) in the expression of these fatty acid transporters (Figure 8A-B).

We next looked at the expression levels of several major genes involved in fat metabolism, including genes coding for the transcription factor *Srebp-1c* (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c), the lipogenic enzyme *Fas* (Fatty Acid Synthase), *Ucp3* (Uncoupling protein 3) and *Acc1* (Acetyl-CoA Carboxylase 1) (Liu et al., 2009), in the *tibialis* of controls and sedentary and trained ALS mice. As evidenced in Figure 8C, the expression levels of *Srebp-1c* were found profoundly lowered in ALS *tibialis* in comparison to controls. The swimming-based training induced a significant reactivation of *Srebp* expression in ALS *tibialis*, whereas no effects could be recorded with the running-based training (Figure 8C). Interestingly, the expression profile of *Fas* (Figure 8D) and *Ucp3* (Figure 8E) paralleled those of *Srebp*, with a decrease in sedentary ALS *tibialis*, and a significant increase in swimming-based training had no effect on the expression of *Ucp3* but induced a significant increase of *Fas*. By contrast, *Acc1* 





expression levels did not display significant alterations in its mRNA expression, in any experimental context (Figure 8F).

These results, indicating that the expression of several lipogenic genes *i.e.* Fas and *Ucp3* (Liu et al., 2009) are enhanced by the swimming-based training, prompted us to evaluate the expression profile of diacylglycerol acyltransfererase 1 (*Dgat1*), which was proved sufficient to increase muscle fat content, associated to PDH inhibition and UCP3 overexpression (Liu et al., 2009). As evidenced in Figure 8G, the levels of *Dgat1* mRNA expression were significantly lower in ALS *tibialis*, when compared to controls. Importantly, the swimming-based training induced a significant increase in *Dgat1* expression levels (Figure 8G), suggesting that, in addition of favoring the uptake of fatty acids, the swimming-based training might favor the neosynthesis of lipids. A significant increase of *Dgat1* expression was also recorded in the running *tibialis*, albeit lower than in swimming (Figure 8G).

In order to explore the hypothesis that swimming favored fat deposition in ALS muscle, we quantified by HPLC the levels of triacyglycerol (TAG) in the sedentary and trained ALS *tibialis* and control muscles. As expected, we found a decrease of TGA quantity in the ALS *tibialis* when compared to controls (Figure 8H). Importantly, the swimming-based training induced a 2-fold increase in TAG levels in the ALS *tibialis*, which reached levels comparable to controls, whereas the running-based training only increased TAG levels by 1.4-fold (Figure 8H).





#### Discussion

We report here that a specific exercise paradigm, which is based on a high intensity and amplitude swimming exercise, is able to significantly improve the glucose metabolism of ALS mice at a systemic level, improving glucose tolerance and, most importantly, favoring fat storage considered today as key criteria for the prognosis in ALS (Fergani et al., 2007; Mariosa et al., 2015; DeJesus-Hernandez et al., 2011). These swimming-induced benefits are associated to a change in the energetic metabolism of the skeletal muscle of ALS mice, leading to energetic fuel shift towards glucose re-use and fat deposition in muscle. Importantly, the beneficial effects of the swimming-based training occurred independently of PDH modulation, thus providing a promising way to synergize the benefits induced by PDK4 targeting (Palamiuc et al., 2015).

The present study demonstrates for the first time that an appropriate exercise paradigm can restore the glucose tolerance, the glycolytic metabolism and the fat deposition in a context of ALS. ALS-induced alteration of glucose tolerance, albeit well established in human ALS patients (Poulton and Rossi, 1993; Pradat et al., 2010), was still a matter of debate in ALS mouse models (Dupuis et al., 2004; Smittkamp et al., 2014). Our results showing a glucose intolerance in SOD1(G93A) mice at the late stage of the disease (P115) concur with the pioneered results found in the SOD1(G86R) ALS mouse model (Dupuis et al., 2004) but contrast with those reported by (Smittkamp et al., 2014) also in SOD1(G93A) mice. This discrepancy is likely to reflect the difference in disease severity affecting the mice used in Smittkamp's and our study, at least for metabolic impairments. Yet, the mice used in the Smittkamp's study displayed a body weight loss at the late stage of less than 15% compared to control mice, whereas this loss was more than 25% loss in the





mice we used in the present study (Deforges et al., 2009) (Figure 1A). The important weight loss characterizing the mice we used is comparable to the weight loss reported in SOD1(G86R) mice at the late stage, in which glucose intolerance was also recorded (Dupuis et al., 2004). In the specific context of ALS, characterized by an excessive lipidic catabolism that is necessarily oxidative, a running-induced attenuation of the glycolytic energetic pathway is likely to reinforce the oxidative metabolism (Van Loon et al., 2001; Romijn et al., 1993), which may cause increased production of free radicals derived from oxygen, worsening the ALS symptoms. By contrast, in favoring a metabolic shift towards a more glycolytic muscular metabolism, a swimming-based training, and more generally a high intensity type exercise, is likely to restore glucose tolerance, muscular glucose use, and fat uptake by adipocytes, the latter point being expected to reduce ALS symptoms. The present results contrast with previous studies that have shown that high intensity runningbased protocols are detrimental to ALS mice (Carreras et al., 2010; Mahoney et al., 2004). One possible explanation for this discrepancy is that, even at high intensity, a running-based training in mice would induce a limited workload ineffective in promoting the activation of the glycolytic pathways. The swimming-based training used in this study has been shown to induce lactate production and specific muscular adaptations, notably fast twitch fiber transitions, as found in high intensity exercises (Grondard et al., 2008). Therefore, it would be useful to record the evolution of metabolic indexes and analyze the adaptation of skeletal muscle phenotype, notably the typology, in the high intensity running-based training protocols to ascertain whether the workload is sufficient to impact on the metabolic pathways.

Skeletal muscle is one of the major tissues storing dietary glucose as glycogen, giving the muscle a major regulator of blood glucose in the fed state. This function is

135





regulated by insulin-elicited signals that lead to the translocation of GLUT4 glucose transporters from intracellular storage micro-vesicles to the sarcolemma resulting in an efficient transport of glucose from blood to the muscle fibers. Yet, its role in insulin-dependent glucose uptake makes GLUT4 not only a major player in normal glucose homeostasis but also an important factor in insulin resistance (Leturgue et al., 1996; Ren et al., 1995; Tsao et al., 1996) and glucose tolerance, two hallmarks of ALS (Reves et al., 1984; Pradat et al., 2010; Saccà et al., 2012). One important data from the present study is the evidence of the significant decrease of GLUT4 expression in ALS skeletal muscle, in patients as well as in mSOD1(G93A) mice, in ALS-sensible as well as in ALS-resistant skeletal muscles *i.e.* slow-twitch soleus and fast-twitch tibialis, respectively, and as early as P70 in ALS tibialis, thus well before symptom appearance. The decrease of Glut4 expression levels is associated with a defect of mobilization of the transporter to the sarcolemma and its persistent sequestration in intracellular vesicles. Both defects would decrease insulinelicited glucose uptake by ALS muscles, a defect already reported in late-stage mSOD1(G93A) mice (Smittkamp et al., 2014). Glucose uptake defects are likely to impact other genes involved in glucose metabolism, such as the key enzyme of the glycolysis GAPDH, which we found to be significantly under-expressed in ALS muscles at the mRNA level. The decrease of the GAPDH protein levels has already been reported in the skeletal muscles of ALS mice (Calvo et al., 2008). Furthermore, muscular GAPDH enzymatic activity has been shown to be impaired by the mSOD1induced oxidative stress in several ALS mouse models (Pierce et al., 2008). We provide here the first evidences for a decrease of GAPDH at the mRNA level in ALS patients and in the mouse ALS tibialis from the presymptomatic phase of the disease (P70). This decrease might be the consequence of a low glycolysis rate due to



defects in glucose uptake by myofibers. We also confirmed an alteration of PDH activation pattern associated to Pdk4 over-expression in the tibialis of mSOD1(G93A) mice as recently evidenced in another ALS mouse model (Palamiuc et al., 2015). Interestingly, the swimming-based training restored muscular Glut4 expression and traffic to cell membrane, and increased GAPDH expression but was unable to restore PDH activation pattern, as shown by the persistently high levels of phospho-PDH and of *Pdk4* expression (Figure 6). Accordingly, blood lactate levels were significantly increased by the swimming-based training, strongly suggesting that pyruvate, which is produced following exercise-induced restoration of the glucose tolerance, on the one hand, and of the muscular glycolysis, on the other, is mainly used to enhance the anaerobic glycolytic pathway. It is noteworthy that this swimming-induced shift to anaerobic glycolytic pathway is associated with the fat storage in ALS *tibialis*, likely resulting from 1) lipid uptake and oxidation, as suggested by the increase of Vldlr and Cd36 expression levels and of citrate synthase and respiratory chain activities, and 2) triglyceride synthesis, as suggested by the swimming-induced expression of lipogenesis genes such as Fas, Acc1 and Dgat1. Interestingly, in humans, the exercise-induced accumulation of intramuscular triglyceride and protection against insulin resistance correlated with an increase in DGAT1 expression levels (Schenk and Horowitz, 2007). Moreover, the skeletal muscles of mice overexpressing DGAT1 display an increase of muscular triglyceride synthesis coupled with fatty acid oxidation (Liu et al., 2009). In addition, and in line with our results in the swimmingtrained ALS tibialis, Glut4, Cd36, Pdk4 and Ucp3 expression levels were increased in Dgat1-overexpressing muscles (Liu et al., 2009).

PARIS DESCARTES

The depress in the autophagic process in ALS skeletal muscle (Dobrowolny et al., 2008; Crippa et al., 2013; Onesto et al., 2011; Xiao et al., 2015) in absence of

137





obvious mSOD1 aggregation (Wei et al., 2012) remained an unresolved issue.

Our data showed an accumulation of the LC3B protein associated with a decrease of Lc3b mRNA in the tibialis of symptomatic ALS mice, further substantiating the hypothesis that an autophagic flux blockade occurred in ALS tibialis (Xiao et al., 2015). Very interestingly, although autophagy failed to be induced by classic procedure with colchicine (Mammucari et al., 2007; Ju et al., 2010) in ALS muscle(Xiao et al., 2015), the present results unambiguously indicate that the exercise-induced autophagic process can be activated in ALS muscle. Moreover, our data suggest the set up in ALS muscle of a vicious circle that links metabolic defects to autophagic process impairments. The flux of intracellular vesicles, including autophagosome or GLUT4 containing-vesicles, mainly depends on anaerobic glycolysis that occurs directly at the level of the moving vesicles (Zala et al., 2013). Exercise-induced GLUT4 addressing to the plasma membrane is dependent of autophagy (He et al., 2012). The glucose intolerance, characteristic of ALS, would compromise the vesicular traffic, leading both to a reduction of the autophagic flux and in turn to a even more important decrease in GLUT4 concentration at the plasma membrane, progressively worsening muscular metabolic impairments. In this context, the strong glucose demand induced by a high intensity exercise in a fast-twitch glycolytic muscle, such as a swimming-based exercise in *tibialis*, would force glucose uptake by the exercised muscle, feeding the glycolytic pathway which is essential for mobilizing the vesicular flux leading to GLUT4 mobilization to the cell membrane, and ultimately resulting in an improvement of the muscular energetic metabolism. Accordingly, autophagy inhibition led to a significant reduction of the swimminginduced increase of *Glut4* and *Gapdh* expression levels in the *tibialis* (Figure 5).



Interestingly, the swimming-induced shift in the metabolic pathways is correlated to a significant neuroprotection at the level of the lumbar motor neurons (Deforges et al., 2009). By contrast, the running-induced no (Deforges et al., 2009; Veldink et al., 2003), a transient (Carreras et al., 2010) or a weak and sustained (Kaspar et al., 2005) neuroprotection. Since the ALS-induced metabolic alterations is though to precede the motor neuron death in ALS mice (Dupuis et al., 2004), reducing these alterations through high intensity exercise is expected to limit motor neuron death. Besides, reinforcing the oxidative pathway by an endurance exercise is likely to contribute to the neurodegenerative process. Therefore, it could be speculated that, in the specific context of ALS, an endurance running-based exercise would rather worsen the ALS-induced metabolism defect and reduce the neuroprotective pathways triggered by physical exercise. By contrast, through the reactivation of the glycolytic metabolism, a swimming-based training would limit the ALS-induced metabolism defects in synergy with the activation of the other neuroprotective pathways triggered by physical activity, accounting for the beneficial effects of the swimming-based training in ALS mice.

PARIS DESCARTES

The present data suggest that, in addition to PDK4 inhibition (Palamiuc et al., 2015), switching the muscle metabolism to a more glycolytic one, which is likely to be induced by well-designed exercise programs, may provide synergistic beneficial effects for ALS patients.





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

Barrientos, A., Barros, M.H., Valnot, I., Rötig, A., Rustin, P., and Tzagoloff, A. (2002). Cytochrome oxidase in health and disease. Gene *286*, 53–63.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol *37*, 911–917.

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.

Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., Munsat, T.L., and World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord. *1*, 293–299.

Calvo, A.C., Moreno-Igoa, M., Manzano, R., Ordovás, L., Yagüe, G., Oliván, S., Muñoz, M.J., Zaragoza, P., and Osta, R. (2008). Determination of protein and RNA expression levels of common housekeeping genes in a mouse model of neurodegeneration. Proteomics *8*, 4338–4343.

Carreras, I., Yuruker, S., Aytan, N., Hossain, L., Choi, J.-K., Jenkins, B.G., Kowall, N.W., and Dedeoglu, A. (2010). Moderate exercise delays the motor performance decline in a transgenic model of ALS. Brain Res. *1313*, 192–201.

Crippa, V., Boncoraglio, A., Galbiati, M., Aggarwal, T., Rusmini, P., Giorgetti, E., Cristofani, R., Carra, S., Pennuto, M., and Poletti, A. (2013). Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. Front Cell Neurosci *7*, 234.

Deforges, S., Branchu, J., Biondi, O., Grondard, C., Pariset, C., Lécolle, S., Lopes, P., Vidal, P.P., Chanoine, C., and Charbonnier, F. (2009). Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. The Journal of Physiology *587*, 3561–3572.

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.

Desport, J.C., Preux, P.M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J.M., Beaufrère, B., and Couratier, P. (2001). Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Am. J. Clin. Nutr. *74*, 328–334.

Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., Bonconpagni, S., Belia, S., Wannenes, F., Nicoletti, C., et al. (2008). Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. Cell Metab. *8*, 425–436.





Dupuis, L., Oudart, H., René, 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., 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., Pradat, P.F., Ludolph, A.C., and Loeffler, J.P. (2011). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet Neurology *10*, 75–82.

Fergani, A., Oudart, H., Gonzalez De Aguilar, J.-L., Fricker, B., René, F., Hocquette, J.-F., Meininger, V., Dupuis, L., and Loeffler, J.-P. (2007). Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. J. Lipid Res. *48*, 1571–1580.

Ferraiuolo, L., Higginbottom, A., Heath, P.R., Barber, S., Greenald, D., Kirby, J., and Shaw, P.J. (2011). Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. Brain *134*, 2627–2641.

Finkelstein, A., Kunis, G., Seksenyan, A., Ronen, A., Berkutzki, T., Azoulay, D., Koronyo-Hamaoui, M., and Schwartz, M. (2011). Abnormal changes in NKT cells, the IGF-1 axis, and liver pathology in an animal model of ALS. PLoS ONE *6*, e22374.

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.

Galbiati, M., Crippa, V., Rusmini, P., Cristofani, R., Cicardi, M.E., Giorgetti, E., Onesto, E., Messi, E., and Poletti, A. (2014). ALS-related misfolded protein management in motor neurons and muscle cells. Neurochem. Int. *79*, 70–78.

Grondard, C., Biondi, O., Pariset, C., Lopes, P., Deforges, S., Lécolle, S., Gaspera, B.D., Gallien, C.-L., Chanoine, C., and Charbonnier, F. (2008). Exercise-induced modulation of calcineurin activity parallels the time course of myofibre transitions. J. Cell. Physiol. *214*, 126–135.

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., and Deng, H.X. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science *264*, 1772–1775.

Harno, K., Rissanen, A., and Palo, J. (1984). Glucose tolerance in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neurol. Scand. *70*, 451–455.

Harwood, C.A., McDermott, C.J., and Shaw, P.J. (2009). Physical activity as an exogenous risk factor in motor neuron disease (MND): a review of the evidence. Amyotrophic Lateral Sclerosis *10*, 191–204.





He, C., Bassik, M.C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., An, Z., Loh, J., Fisher, J., Sun, Q., et al. (2012). Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. Nature *481*, 511–515.

Hegedus, J., Putman, C.T., Tyreman, N., and Gordon, T. (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. The Journal of Physiology *586*, 3337–3351.

Hutchins, P.M., Barkley, R.M., and Murphy, R.C. (2008). Separation of cellular nonpolar neutral lipids by normal-phase chromatography and analysis by electrospray ionization mass spectrometry. J. Lipid Res. *49*, 804–813.

Ju, J.-S., Varadhachary, A.S., Miller, S.E., and Weihl, C.C. (2010). Quantitation of "autophagic flux" in mature skeletal muscle. Autophagy *6*, 929–935.

Kaspar, B.K., Frost, L.M., Christian, L., Umapathi, P., and Gage, F.H. (2005). Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *57*, 649–655.

Kirkinezos, I.G., Hernandez, D., Bradley, W.G., and Moraes, C.T. (2003). Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *53*, 804–807.

Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P.N., Guillet, P., and Meininger, V. (1996). Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. Lancet *347*, 1425–1431.

Leturque, A., Loizeau, M., Vaulont, S., Salminen, M., and Girard, J. (1996). Improvement of insulin action in diabetic transgenic mice selectively overexpressing GLUT4 in skeletal muscle. Diabetes *45*, 23–27.

Lindauer, E., Dupuis, L., Müller, H.-P., Neumann, H., Ludolph, A.C., and Kassubek, J. (2013). Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. PLoS ONE *8*, e67783.

Liu, L.-F., Purushotham, A., Wendel, A.A., Koba, K., Deluliis, J., Lee, K., and Belury, M.A. (2009). Regulation of adipose triglyceride lipase by rosiglitazone. Diabetes Obes Metab *11*, 131–142.

Van Loon, L.J., Greenhaff, P.L., Constantin-Teodosiu, D., Saris, W.H., and Wagenmakers, A.J. (2001). The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. J. Physiol. (Lond.) *536*, 295–304.

Mahoney, D.J., Rodriguez, C., Devries, M., Yasuda, N., and Tarnopolsky, M.A. (2004). Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve *29*, 656–662.

Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., et al. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. Cell Metab. *6*, 458–471.





Mariosa, D., Kamel, F., Bellocco, R., Ye, W., and Fang, F. (2015). Association between diabetes and amyotrophic lateral sclerosis in Sweden. Eur. J. Neurol.

Miquel, E., Cassina, A., Martínez-Palma, L., Bolatto, C., Trías, E., Gandelman, M., Radi, R., Barbeito, L., and Cassina, P. (2012). Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. PLoS ONE *7*, e34776.

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.

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.

Pierce, A., Mirzaei, H., Muller, F., De Waal, E., Taylor, A.B., Leonard, S., Van Remmen, H., Regnier, F., Richardson, A., and Chaudhuri, A. (2008). GAPDH is conformationally and functionally altered in association with oxidative stress in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. J. Mol. Biol. *382*, 1195–1210.

Poulton, K.R., and Rossi, M.L. (1993). Peripheral nerve protein glycation and muscle fructolysis: evidence of abnormal carbohydrate metabolism in ALS. Funct. Neurol. *8*, 33–42.

Pradat, P.-F., Bruneteau, G., Gordon, P.H., Dupuis, L., Bonnefont-Rousselot, D., Simon, D., Salachas, F., Corcia, P., Frochot, V., Lacorte, J.-M., et al. (2010). Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler *11*, 166–171.

Pupillo, E., Messina, P., Giussani, G., Logroscino, G., Zoccolella, S., Chiò, A., Calvo, A., Corbo, M., Lunetta, C., Marin, B., et al. (2014). Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: a European population-based case-control study. Ann. Neurol. *75*, 708–716.

Ren, J.M., Marshall, B.A., Mueckler, M.M., McCaleb, M., Amatruda, J.M., and Shulman, G.I. (1995). Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. J. Clin. Invest. *95*, 429–432.

Reyes, E.T., Perurena, O.H., Festoff, B.W., Jorgensen, R., and Moore, W.V. (1984). Insulin resistance in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. Sci. *63*, 317–324.

Richter, E.A., and Hargreaves, M. (2013). Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. Physiol. Rev. *93*, 993–1017.

Romijn, J.A., Coyle, E.F., Sidossis, L.S., Gastaldelli, A., Horowitz, J.F., Endert, E., and Wolfe, R.R. (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. Am. J. Physiol. *265*, E380–391.




Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., and Deng, H.X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature *362*, 59–62.

Saccà, F., Quarantelli, M., Rinaldi, C., Tucci, T., Piro, R., Perrotta, G., Carotenuto, B., Marsili, A., Palma, V., De Michele, G., et al. (2012). A randomized controlled clinical trial of growth hormone in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, neuroimaging, and hormonal results. J. Neurol. *259*, 132–138.

Schenk, S., and Horowitz, J.F. (2007). Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. J. Clin. Invest. *117*, 1690–1698.

Smittkamp, S.E., Morris, J.K., Bomhoff, G.L., Chertoff, M.E., Geiger, P.C., and Stanford, J.A. (2014). SOD1-G93A mice exhibit muscle-fiber-type-specific decreases in glucose uptake in the absence of whole-body changes in metabolism. Neurodegener Dis *13*, 29–37.

Tsao, T.S., Burcelin, R., Katz, E.B., Huang, L., and Charron, M.J. (1996). Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle. Diabetes *45*, 28–36.

Veldink, J.H., Bär, P.R., Joosten, E. a. J., Otten, M., Wokke, J.H.J., and Van den Berg, L.H. (2003). Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. Neuromuscul. Disord. *13*, 737–743.

Wei, R., Bhattacharya, A., Chintalaramulu, N., Jernigan, A.L., Liu, Y., Van Remmen, H., and Chaudhuri, A.R. (2012). Protein misfolding, mitochondrial dysfunction and muscle loss are not directly dependent on soluble and aggregation state of mSOD1 protein in skeletal muscle of ALS. Biochem. Biophys. Res. Commun. *417*, 1275–1279.

Wu, P., Inskeep, K., Bowker-Kinley, M.M., Popov, K.M., and Harris, R.A. (1999). Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. Diabetes *48*, 1593–1599.

Xiao, Y., Ma, C., Yi, J., Wu, S., Luo, G., Xu, X., Lin, P.-H., Sun, J., and Zhou, J. (2015). Suppressed autophagy flux in skeletal muscle of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model during disease progression. Physiol Rep *3*.

Zala, D., Hinckelmann, M.-V., Yu, H., Lyra da Cunha, M.M., Liot, G., Cordelières, F.P., Marco, S., and Saudou, F. (2013). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. Cell *152*, 479–491.





Figure 1. Differential effects of running- and swimming-based trainings on the global metabolic status of ALS mice.

A, Body weight of control and ALS mice at P70, sedentary controls and ALS mice at P115 and trained ALS mice at P115 (n=18 in each group). B, Epididymal white adipose tissue (EAT) weight at P115 (n=8), C, representative pictures of EAT at P115, (scale bar: 1cm) and D, distribution of EAT adipocytes cross-section area (n=3). E, Mass of liver major lobe (sedentary control and ALS mice n=9; trained ALS mice n=3) and F, representative pictures of liver sections stained by hemalun in sedentary controls and ALS mice, (scale bar: 100  $\mu$ m). All data are shown as mean ± SD; significance is reported versus control (#) or between ALS conditions (\*): p<0.05

Figure 2. The swimming-based training improves glucose tolerance in ALS mice.

A, Glucose tolerance test in sedentary controls and ALS mice at P70 and in sedentary controls and sedentary and trained ALS mice at P115, after a swimming-(B) or a running- (C) based training (sedentary controls and ALS mice n=6; trained ALS mice n=4). D, Blood lactate levels at P115, 2 hours after a running or a swimming session (n=4). All data are shown as mean  $\pm$  SD significance is reported versus control (#) or between ALS conditions (\*): p<0.05

Figure 3. Physical exercise enhances expression and mobilization of GLUT4 in ALS skeletal muscles.

A, Quantification by RT-qPCR of *GLUT4* mRNA expression levels in human muscular biopsies (control patient n=4; ALS patient n=7) mRNA expression levels are normalized with *RPL13*. B-C, Quantification by RT-qPCR of *Glut4* mRNA expression levels in the *tibialis* (B) and in the *soleus* (C) of sedentary controls and sedentary and trained ALS mice at P115. Immunodetection of GLUT4 in muscle transversal section in *tibialis* (D) and *soleus* (F) (scale bar: 20µm). Analysis of GLUT4 subcellular localization in stained fibers in *tibialis* (E) and *soleus* (G). mRNA expression levels





are normalized with *Rps26.* All data are shown as mean  $\pm$  SD; significance is reported versus control (#) or between ALS conditions (\*): p<0.05

Figure 4. The swimming-based training enhances the GAPDH expression in ALS skeletal muscles.

A, Quantification by RT-qPCR of *GAPDH* mRNA expression levels in human muscular biopsies (control patient n=6; ALS patient n=10) mRNA expression levels are normalized with *RPL13*. Quantification by RT-qPCR of *Gapdh* mRNA expression levels in the *tibialis* (B) and in the *soleus* (D) at P115 (n=5). Western blot analysis and quantification of GAPDH protein in *tibialis* (C) and *soleus* (E) at P115 (n=3). mRNA expression levels are normalized with *Rps26*. All data are shown as mean  $\pm$ SD; significance is reported versus control (#) or between ALS conditions (\*): p<0.05

Figure 5. Swimming-induced enhancement of GLUT4 and GAPDH expression in ALS *tibialis* is linked to exercise-induced autophagy.

Quantification by RT-qPCR of the expression of *Beclin1* (A), *Bcl2* (B), *Lc3b* (C) and *P62* (D) mRNA levels in sedentary controls and sedentary and trained ALS mice at P115 in the *tibialis*. Quantification by RT-qPCR of the expression of *Beclin1* (E), *Bcl2* (F), *Lc3b* (G) and *P62* (H) mRNA levels in sedentary controls and ALS mice at P115 in the *soleus* (n=5). I, Western blot analysis and quantification of LC3B I and LC3B II proteins in the *tibialis* of sedentary controls and sedentary and trained ALS mice P115 (n=3). Effects of the autophagy inhibition by either chloroquine (CQ) or 3-methyladenin (3-MA) after 3 days of swimming on *Glut4* (J) and *Gapdh* (K) mRNA expression levels (n=3). mRNA expression levels are normalized with *Rps26*. All data are shown as mean  $\pm$  SD; # significant refer to control; significance is reported versus control (#) or between ALS conditions (\*): p<0.05

Figure 6. The swimming-based training exerts its beneficial effects independently of PDH modulation.

Western blot analysis and quantification of the phosphorylation status of PDH-E1 $\alpha$  in the *tibialis* of sedentary controls and sedentary and trained ALS mice (A) and





in the *soleus* of sedentary controls and ALS mice (B) at P115 (n=3). Quantification by RT-qPCR of *Pdk4* expression levels in the *tibialis* of sedentary controls and sedentary and trained ALS mice (C) and in the *soleus* of sedentary controls and ALS mice (D) at P115 (n=5). mRNA expression levels are normalized with *Rps26*. All data are shown as mean  $\pm$  SD; significance is reported versus control (#) or between ALS conditions (\*): p<0.05

Figure 7. Both exercise paradigms induce adaptations of the oxidative energetic pathway in ALS *tibialis*.

Evaluation of the enzymatic activity of citrate synthase activity (CS) (nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) (A) and of the cytochrome oxidase (COX) (nmol. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) (B) in the *tibialis* of sedentary controls and sedentary and trained ALS mice at 115 days-of-age (n=3). All data are shown as mean  $\pm$  SD; significance is reported versus control (#) or between ALS conditions (\*): p<0.05

Figure 8. The swimming-based training leads to significant triglyceride accumulation in ALS muscles.

Quantification by RT-qPCR of the expression of *Cd36* (cluster of differentiation 36) (A), *Vldlr* (very-low-density-lipoprotein receptor) (B), *Srebp-1c* (Sterol regulatory element-binding protein-1c) (C), *Fas* (Fatty Acid Synthase) (D), *Ucp3* (Uncoupling Protein 3) (E), *Acc1* (Acetyl-CoA Carboxylase1) (F), and *Dgat1* (DiGlyceride Acyl-Transferase-1) (G) in the *tibialis* of sedentary controls and sedentary and trained ALS mice at P115 (n=5). Quantification of trigacylglycerol (TAG) ( $\mu$ mol.g<sup>-1</sup>) (H) in the *tibialis* of sedentary and trained ALS mice P115 (n=4). mRNA expression levels are normalized with *Rps26*. All data are shown as mean ± SD; significance is reported versus control (#) or between ALS conditions (\*): p<0.05















В



## Figure 3



Sed Control

D





100%



Run ALS

Sed Control

F

Swim ALS

Sed ALS





Sed ALS



0% Sed Sed Run Swim Control ALS ALS ALS



tibialis at P115

С

2

1,5

1

0,5

0

Glut4 mRNA relative expression

soleus at P115

Sed Sed Control ALS







soleus at P115

soleus at P115

















1

0,5

0

Sed

Control

Bcl2 |

Sed ALS



Lc3b mRNA relative expression

Κ

Sed ALS

1,5

1

0,5

0

soleus at P115





Sed

Control

1

0,5

0

J













Figure 7

Sed Sed Control ALS

Run ALS

Swim ALS

0,5 0









0

Sed

Control

Sed

ALS

Run

ALS

Swim

ALS









<u>_</u>
Ð
0
<u></u>

source	Human	Human	Human	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice	Mice
Reverse	TCTAGACGGCAGGTCAGGTC	AGG ACC GCA AAT AGA AGG AAG A	GAGTCCGTGGGTCTTGAG	GOBCAAGCAGGTCTGAATOGTG	TGA CTG COG AAA CAT CTC TG	OGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG	AGACACCATCCTGGCGAGTTTC	TTC AGA TCC GAA CAC AGC GT	ACTGGGGCATCGTAGTTGAG	GCC TGG TAG GCA TTC TGT AGT	TGT GAG GGA GAT GCT CAG TG	CCT CCC GCC CTT AGT TG	GATGAGCOGGACATCTTOCACT	GCC AAA GTG TCC ATG TTT CA	ATGTGGTGAAGGTGTGAAG	GGC CCG GGA AGT CAC TGT	GGC GTA TCA TGG CTT GAA AT	CCTATAACTAGGTCTTTGCAGATATGG
Forward	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	CTT CAT CAT TGG CAT GGG TTT	AAGGTOGTGOGTCTGAAG	AGGAGAACAACGGTCGTGCCAAA	GCC TCT TCC TGA CAA ACG AG	TGAACOGGCATCTGCACAC	TTCAAGATCCTGGACCGGGTCAC	ATT AAT GGC ACA GAC GCA GC	<b>CCTCAGCCTTCTTCCATGAG</b>	AGA GAT CCC GAG ACG CTT CT	GTG GAC CTC ATG GCC TAC AT	CTG CAA AGC GTA GGT ACC AA	CATGCOGTOCGAGAAGACCT	AGG GAA CAC AGC AAG CT	TGTGATGTGGGTAGCAGTAGTC	GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT	ATG AGT TIT GCC TCC ATT CG	GAGOOOCTGAAGGAATGOO
Name	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glucose Transporter 4	Ribosomal Protein L13a (RPL13A)	26S ribosomal	Acetyl-CoA carboxylase	B-cell lymphoma 2	Bedin1	Cluster of differentiation 36	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	Fatty Acid Synthase	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glucose transporter 4	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3	Sequestosome 1 (p82)	Pyruvate deshydrogenase kinase	Sterol regulatory element-binding protein	Uncoupling protein 3	Very-low-density-lipoprotein receptor
Sign	GAPDH	GLUT4	RPL13	Rps26	Acc1	Bcl2	Beclin1	Cd36	Dgatt	Fas	Gapdh	Glut4	Lc3b	P62	Pdk4	Srebp-1c	Ucp3	VIdIr









#### 2. Conclusion article

L'ensemble de ces données suggèrent une modulation du métabolisme énergétique dépendante du type d'exercice physique dans la SLA.

En contradiction avec deux études précédentes, l'une dans le modèle SOD1(G93A) (Smittkamp et al., 2014) et l'autre dans le modèle SOD1(G86R) (Dupuis et al., 2004), nous mettons en évidence une intolérance au glucose, présente bien avant l'apparition des symptômes (P70).

L'analyse comparée de deux types d'exercice physique met en évidence qu'un exercice de forte intensité tel que la nage, limite significativement la résistance au glucose et favorise le métabolisme glycolytique. Cette adaptation est corrélée à une augmentation des réserves lipidiques, des niveaux d'expression des transcrits tels que *Gapdh* ou *Glut4*, mettant en évidence une amélioration de la ressource énergétique.

Une récente étude montre une amélioration du métabolisme énergétique des souris SLA, au niveau musculaire, *suite à l'inactivation de l'activité de la PDH* (Palamiuc et al., 2015). Or, les améliorations observées, à la suite d'un exercice de nage, n'empruntent pas la même voie métabolique. En effet, l'étude de l'état de phosphorylation de PDH et des enzymes permettant sa phosphorylation ne montre pas de différences significatives dans les muscles SLA.

L'exercice de nage permet une réutilisation du glucose disponible dans le sang. Nous nous sommes intéressés au métabolisme énergétique musculaire au niveau du *tibialis*, un muscle rapide et donc très touché dans la SLA (Frey et al., 2000). Nous avons entrepris l'analyse de la distribution subcellulaire du récepteur au glucose, GLUT4 ainsi que de son expression. Cela a permis de mettre en évidence un défaut de localisation de ce récepteur dans le *tibialis* SLA. La diminution du récepteur GLUT4 à la membrane peut, en partie, expliquer résistance au glucose observée dans ces souris. Or, l'exercice de nage induit une augmentation des transcrits d'environ 60% et une relocalisation membranaire, de la protéine GLUT4, permettant d'expliquer une augmentation de la tolérance au glucose, semblable au contrôle.



De plus, une diminution de l'expression de GAPDH est observée dans le *tibialis* SLA, aussi bien au niveau des transcrits que de la protéine. Quel que soit le type d'exercice, une augmentation des transcrits et de la protéine est observée mais avec une efficacité différente. L'exercice de course permet une augmentation de l'expression de la GAPDH semblable au contrôle, tandis que l'exercice de nage permet une expression de la protéine et des transcrits au moins deux fois supérieure au contrôle.

PARIS DESCARTES

Un effet important de l'entraînement à la nage, pour la SLA, est l'augmentation de stockage des TG dans le muscle et des lipides dans les adipocytes. Dans le *tibialis,* on observe une augmentation des transcrits des gènes de la lipogenèse et des récepteurs aux TG. Une des enzymes, DGAT1, permettant la transformation des acides gras en TG, voit aussi son expression augmentée. Or, DGAT1 permet le couplage entre la bêta-oxydation et la synthèse des TG. L'étude des capacités enzymatiques de la citrate synthase (CS) et de la cytochrome oxydase (COX) [deux enzymes intervenant dans la mitochondrie au niveau du cycle de Krebs (CS) ou de la chaîne respiratoire (COX)], montre une amélioration après un exercice de nage. L'ensemble de ces résultats est corrélé à la quantité de TG observée dans le *tibialis*.

Pour l'exercice de course, il est attendu une utilisation préférentielle du métabolisme oxydatif (Van Loon et al., 2001; Romijn et al., 1993). Dans nos conditions, après un entraînement à la course de 45 jours, le poids des animaux ainsi que la masse grasse ne sont pas différentes des souris SLA sédentaires.

L'exercice de nage, de forte intensité est donc bénéfique pour les souris SLA, ces résultats semblent aller à l'encontre de la littérature où il a été montré qu'un exercice de course de forte intensité était délétère pour les souris SLA (Carreras et al., 2010; Mahoney et al., 2004). Les différences pourraient provenir du fait que la nage et la course, même à haute intensité, n'activent pas les mêmes voies métaboliques dans le muscle.

Dans le sens où un exercice de course induit une augmentation de la glycolyse aérobie avec une forte production de ROS, les effets peuvent être délétères. Pour pouvoir conclure, il faudrait réaliser un exercice de course de forte intensité et quantifier le niveau de stress oxydant dans les cellules musculaires.



L'étude de l'autophagie montre des variations différentes suivant l'analyse des transcrits ou des protéines. Dans la SLA, une diminution des transcrits et une augmentation des protéines mettent en avant un défaut de fonctionnement de l'autophagie. L'exercice de nage permet, dans le tibialis, de restaurer l'expression de l'ensemble de ces facteurs, ce que ne permet pas l'exercice de course. Ainsi, une adaptation du protocole de nage a été réalisée à P70, après seulement trois jours de nage, une augmentation des transcrits est observable. L'utilisation de drogue inhibant une étape clé de l'autophagie, fusion et dégradation lysosomale (3MA ou chloroquine), montrent les mêmes effets, c'est-à-dire : une absence de modulation du niveau transcriptionnel des ARNm de la Gapdh ou de Glut4. Les bénéfices apportés par l'exercice de nage ne sont plus visibles. En 2012, He et collaborateurs démontrent l'existence d'une autophagie liée à l'exercice physique (He et al., 2012); en 2013, Zala et collaborateurs montrent une glycolyse spécifique du trafic vésiculaire (Zala et al., 2013). Ainsi, l'augmentation de GAPDH pourrait améliorer l'autophagie dans les souris SLA, et, l'ensemble des améliorations attribuées à l'exercice de nage semble être possible par une restitution de l'autophagie.

UNIVERSI

PARIS DESCARTES

Les études précédentes avaient montré que seul l'exercice de nage était capable de significativement protéger les MN (Deforges et al., 2009). Les données présentes suggèrent qu'au moins en partie, c'est en induisant une adaptation du métabolisme énergétique musculaire que l'entraînement parvient à protéger les MN de la mort induite par la SLA.



Résultats complémentaires



9. AMPK au centre des modulations, du métabolisme énergétique, induites par l'exercice physique dans le *tibialis* d'un modèle souris SOD1(G93A)





#### **1.Introduction**

Dans le contexte actuel de la SLA, les atteintes du métabolisme énergétique sont largement démontrées, aussi bien dans les modèles animaux que chez les patients. De récentes études suggèrent, dans le modèle souris SOD1(G93A), une résistance au glucose ainsi qu'une diminution et un défaut de localisation des transporteurs au glucose GLUT4, majoritaire dans le muscle (Desseille, soumis). Les atteintes métaboliques observées, suggèrent une diminution de l'utilisation du glucose au profit de l'utilisation des lipides, quoique l'ensemble des transcrits codant pour certaines protéines du métabolisme, aussi bien glucidique que lipidique, soit diminué. Pour permettre de pallier à ce définit énergétique, un exercice physique est réalisé en pré-symptomatique durant 45 jours. Les résultats suggèrent une amélioration de l'ensemble des processus métaboliques, exclusivement après un entraînement à la nage. Les filières énergétiques, stimulées lors de l'exercice de nage, varient de celles d'un exercice de course. Cela suggère que, suivant la filière énergétique utilisée, un exercice physique peut s'avérer bénéfique dans un modèle souris de SLA (Desseille, soumis). Ces travaux viennent en renfort d'une première étude réalisée en 2009, montrant l'effet neuroprotectif d'un exercice de nage et l'absence d'amélioration à l'issue de l'exercice de course (Deforges et al., 2009). L'hypothèse suggérée qu'une amélioration de l'autophagie, stimulée par l'exercice de nage, serait nécessaire à la réutilisation du glucose et, au rétablissement des niveaux d'expression des transcrits de protéines, intervenant dans l'ensemble du métabolisme énergétique (Desseille, soumis).

AMPK est une des principales protéines régulatrices du métabolisme énergétique (Pimentel et al., 2013) et de la réponse à l'insuline (Kahn et al., 2005), dans le muscle. Il a été montré, qu'un entraînement physique stimule AMPK dans les muscles humains ou murins (Richter and Ruderman, 2009). La création d'un modèle souris KO pour l'isoforme α2 d'AMPK montre, à l'issue d'un exercice physique, la nécessité de cette isoforme dans le métabolisme énergétique et le maintien de l'intégrité du muscle. La délétion de cette isoforme provoque une insulinorésistance, une intolérance au glucose et une augmentation du taux de TG circulants (Viollet Andreelli 2003, Villena Viollet 2004). L'activation d'AMPK est proposée comme





régulateur des effets de l'exercice physique et de la captation du glucose permettant une meilleure sensibilité à l'insuline (Koshinaka et al., 2009). Des travaux envisagent AMPK comme un modulateur de l'autophagie à l'issue d'un exercice physique (Egan et al., 2010; Kim et al., 2011).

Liu et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation significative de l'activité d'AMPK dans les motoneurones de patients SLA TDP-43 (Liu et al., 2015a). Les études réalisées sur les souris SOD1(G93A) montrent une augmentation de la phosphorylation d'AMPK dans le cortex cérébral, la moelle épinière et les muscles des pattes arrière à P120 (Zhao et al., 2011). Une nourriture enrichie en acides gras et cholestérol a été donnée à ces souris et permet une diminution significative de l'activation d'AMPK (Zhao et al., 2011). Une augmentation de la durée de vie et une diminution des symptômes sont aussi observées à l'issue de cette adaptation alimentaire. Différents traitements d'activation et d'inhibition ont été réalisés sur divers modèles souris de SLA. L'activation d'AMPK, à la metformine dans le modèle SOD1(G93A) induit une accélération des symptômes dans les souris femelles (Kaneb et al., 2011), alors qu'une activation au latrepirdine, dans le même modèle, induit une augmentation de la durée de vie et un décalage dans l'apparition des symptômes (Coughlan et al., 2015). L'inhibition d'AMPK permet, dans le modèle TDP-43, une amélioration de l'état de santé des souris (Liu et al., 2015b). Enfin, l'ablation du gène codant pour l'isoforme  $\alpha 2$ , dans le modèle SOD1(G93A), ne modifie pas l'âge d'apparition ni la sévérité des symptômes (Vergouts et al., 2015).

L'ensemble des études met en évidence, une altération de l'activation dans la SLA, aussi bien au niveau des souris que des patients. Cependant, suivant les drogues utilisées, l'apport bénéfique d'une activation d'AMPK reste soumis à controverse. AMPK est une molécule, se situant au niveau d'un carrefour métabolique, intervenant dans une grande quantité de voies de régulation intracellulaires telle que l'homéostasie, l'autophagie ou le métabolisme des ARN.

L'effet de l'exercice physique sur l'activité d'AMPK est dépendant de PGC1α. L'impact de l'exercice physique dans la SLA, sur l'activation d'AMPK, n'a pas encore été étudié. Nous avons donc entrepris l'étude de certaines de ses cibles pour mettre en évidence si, via l'exercice de nage, l'état de phosphorylation d'AMPK est modulé.





## 2. Matériels et méthodes

#### 1. Modèle murin

La lignée B6SJL-Tg (SOD1(G93A))1 GUR/J (Jackson, Bar Harbor, ME, USA) est celle utilisée lors de cette étude. Les souris présentent environ une trentaine de copies du transgène humain SOD1(G93A) et ont été obtenues au sein des Laboratoires Jackson (Jackson, USA).

Le maintien de la lignée s'effectue en croisant un mâle SOD1(G93A) avec une femelle B6SJL (Charles River, Le GenestSt-Isle, France). L'ensemble des portées est génotypé entre P5 et P7 à partir d'un bout de doigt, permettant ensuite l'identification de la souris. Une fois extrait, l'ADN génomique de souris (5ng.µl<sup>-1</sup>) est utilisé pour réaliser une PCR classique ciblant le transgène humain. Seuls les mâles positifs pour l'expression du transgène sont utilisés pour les expériences. Ils seront appelés « SLA »

D'autre part, un croisement entre souris B6SJL permet de donner la population de souris contrôles (Charles River, Le GenestSt-Isle, France).

Les conditions d'élevage des souris sont en accord avec les directives du Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche, concernant l'utilisation et le stockage d'organismes génétiquement modifiés.

#### 2. Entraînements

Dès la phase asymptomatique, (P70), les souris SLA et contrôles, sont soumises à l'un des deux types de protocole d'entraînement. Soit un exercice de course sur tapis roulant, à une vitesse maximale de 13 m.min<sup>-1</sup>, soit un exercice de nage en piscine à contre-courant à un débit maximum de 5 l.min<sup>-1</sup>(Grondard et al., 2008). La vitesse des protocoles dépend de la capacité de la souris au moment de l'effort et peut se trouver adaptée, en cas d'impossibilité à réaliser l'effort demandé. Le protocole d'exercice est de 30 minutes par jour, à raison de 5 jours par semaine.





Les souris SLA soumises à l'exercice physique sont comparées aux souris contrôles et aux souris SLA sédentaires. Les souris SLA entraînées à la course sont nommées « ALS Run » et les souris SLA entraînées à la nage « ALS Swim », dans la suite du manuscrit.

#### 3. Prélèvements

Les souris sont anesthésiées au pentobarbital (60mg.kg-1) avant d'être prélevées. Les tissus utilisés à des fins histologiques sont congelés dans de l'isopentane refroidi à 80°C, et les autres sont placés dans des tubes refroidis dans de l'azote liquide permettant la congélation instantanée du tissu.

Pour les souris ayant réalisé un protocole d'exercice, les tissus sont prélevés deux heures après entraînement.

#### 4. Analyse protéique : le western immuno blot (WIB)

Les muscles sont pris dans leur totalité, pesés puis incubés avec un tampon RIPA (50mM TRIS, 150mM de Nacl, 0,1% de SDS, 1%NP40, NaF 10mM, protease inhibitor Roche 1X, phosphatase inhibitor Sigma 1%), 100µl pour 5mg, avant d'être broyés via l'utilisation de billes de tungstène à une fréquence de 25 Hertz, 3x5 minutes avec un temps de 10 minutes dans la glace, pour éviter l'augmentation de la température de l'échantillon. Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 17000g, le surnageant est récupéré, aliquoté et congelé à -80°C.

La quantité de protéine dans les échantillons est déterminée par la technique du Bradford (Bradford protein assay, Biorad Laboratories, CA). Suivant la protéine étudiée, une quantité de protéine est déposée sur gel d'acrylamide SDS-Page à 10,5% (1,5M Tris, 10,5% polyacrylamide, 0,07% bis acrylamide, 0.1%SDS, 0.05% APS, 0,06% Temed). Les protéines, séparées selon le poids sont transférées sur une membrane PVDF (Amerscham, GE Healthcare Vélizy-Villacoublay, France), suivant le protocole décrit en 1984 (Towbin and Gordon, 1984). Une incubation de la membrane dans du rouge ponceau permet de contrôler la quantité et la qualité du transfert. La membrane est ensuite décolorée dans du TBS tween 0.1%, et incubée dans un bain de saturation de TBS tween 0,1% BSA 4%, pendant une heure à





température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit dans une solution de TBS tween BSA, avec la dilution adéquate de l'anticorps. Le lendemain les membranes sont rincées dans une solution de TBS tween, avant d'être incubées une heure avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Après rinçage du second anticorps, le complexe anticorps primaire/ anticorps secondaire est révélé par luminescence et l'expression des protéines est évaluée sur Enspire (GE Healthcare), ce qui permet la réalisation de clichés de la membrane sur des temps d'exposition adaptés et non saturants.

Les images sont ensuite analysées par ImageJ, l'intensité des bandes de protéine est quantifiée en nombre de pixel et rapportée au contrôle interne (la tubuline). Les rapports de la protéine sur leur contrôle interne permettent d'obtenir des données comparables.

L'ensemble des caractéristiques des anticorps sont reprises dans le tableau suivant :

Sigle	Références anticorps	espèce hôte	μg de protéine déposé	dilution
p-AMPK	Cell Signaling 2531	Rabbit	80	1/1000
AMPK	Cell Signaling 2532	Rabbit	80	1/1000
α-tubuline	Sigma T6074	Mouse	/	1/20 000

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour la quantification de protéine





#### 5. Analyse transcriptionnelle : la RT-qPCR

Pour l'analyse transcriptionnelle, l'ensemble du protocole se déroule à +4°C. Les échantillons de muscle sont soumis au même type de broyage que pour les protéines (paragraphe WIB) mais dans 500µl d'une solution de Trizol Reagent (life technologie, Saint-Aubin, France). A l'issue du broyage, une centrifugation des échantillons est réalisée à 17000g pendant 15 minutes. Le surnageant est réccupéré et mis dans un nouveau tube avec 20% de chloroforme. Les tubes sont mélangés mécaniquement et mis à incuber 3 minutes à température ambiante. Une nouvelle centrifugation est réalisée, 17000g, 15 minutes, et la phase aqueuse est prélevée. Les ARNm sont précipités par 550µl d'éthanol 100% refroidi à -20°C, et, le tout est agité par retournement, avant d'être incubé 30 minutes à -20°C. Une centrifugation de 30 minutes, à 17000g, est réalisée pour permettre la formation d'un culot d'ARN. Deux autres centrifugations similaires seront réalisées pour nettoyer l'ARN, avec de l'éthanol à 75%. Le culot est ensuite mis à sécher puis resuspendu dans de l'eau distillée. Une quantification est réalisée via un Nanodrop et les rapports de densité optique 260/230 et 260/280 permettent d'estimer la quantité et la qualité de la préparation.

1µg d'ARN est ensuite soumis à une transcription inverse permettant ainsi d'obtenir des ADNc (ADN complémentaires). Ces derniers sont utilisés pour réaliser une PCR en temps réel, dans un mélange contenant du SYBR Green, des primers et de l'eau, sur un appareil Taqman ABI Prism 7700 (Applied Biosystems Inc. Courtaboeuf, France). Les échantillons sont déposés en triplicata, et les valeurs obtenues sont analysées par la méthode relative des Ct, où la quantité de produit est obtenue par comparaison avec le contrôle endogène par la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Le gène rapporteur utilisé est *Rps26*.

Pour chaque échantillon, un contrôle négatif, correspondant à l'utilisation d'un microgramme d'ARN n'ayant pas subi la reverse transcriptase, est étudié. L'utilisation d'un polydT lors de la transcription inverse et la sélection de primers ciblant les exons, diminuent l'amplification d'ADN génomique. L'ensemble des couples de primers utilisés est listé dans le tableau suivant :





Sigle	NOM	sens 5' => 3'	anti-sens 5' => 3'
26S	40S ribosomal protein S26	AGGAGAAACAACGGTCGTGCCAAA	GCGCAAGCAGGTCTGAATCGTG
Abca1	ATP-Binding-Cassette protein A1	CTGTTTCCCCCAACTTCTG	TCTGCTCCATCTCTGCTTTC
Chrebp	Carbohydrate-responsive element-binding protein	CACTCAGGGAATACACGCCTAC	ATCTTGGTCTTAGGGTCTTCAGG
Dhcr24	24-dehydrocholesterol reductase	GTTCGTGTGCCTCTTCTTG	TCTTACTGCCCTGTTCCTTC
Fndc5	Fibronectin type III domain-containing protein 5	CAA CGA GCC CAA TAA CAA CA	AGA AGG TCC TCT CGC ATT CTC
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	GAATGCCTTGTGATTGGAGTTG	ACACAGGCCGGGAAGAATG
Pgcla	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$	CAGGCAGTAGATCCTCTTCAAG	AGGCTCAAGAGGGATGAATACC
Prkaa1	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	GCTGTATTCCCGCTGTGTAG	TTAGTTGGCTCCTCCTTTTG
Prkaa2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	CCCTGGTCTCTGTCTTTCTG	CTGGATTTCTGTGTTTTCGG
Tbc1d1	TBC1 domain family menber 1	TCCGCAGTAGCACCTTTAGC	ATTGGCCAATCGTGAACAG

Tableau 5 : Liste des couples de primers utilisés pour la RT-qPCR

#### 6. Analyses statistiques

L'ensemble des données est présentée en moyenne et écart type. Les données sont soumises a un test statistique via le logiciel Systat v 8 (SPSS Inc., Chicago, IL). Les données sont soumises à un test Shapiro-Wilk, suivi d'un t-test pour les données suivant la loi normale, ou un Equal variance ou un Mann-Whitney Rank Sum Test pour les autres. Le sigle # se réfère à la significativité comparée au contrôle, et \* correspond à la significativité entre deux groupes SLA. p<0,05.





### 3. Résultats :

## 1. Modulation d'expression des différentes sous-unités d'AMPK dans le tibialis des souris SOD1(G93A) et impact d'un exercice physique.

La sous-unité catalytique α présente deux isoformes, AMPKα1 et AMPKα2 codées par les gènes *Prkaa1* et *Prkaa2* respectivement.





## Figure 8: Analyse de l'état de phosphorylation d'AMPK dans le *tibialis* des souris SOD1(G93A) à P115

Analyse par WIB de la phosphorylation d'AMPK (A) et par RT-qPCR des transcrits des deux isoformes de la sous-unité alpha d'AMPK, Prkaa1 (B) et Prkaa2 (C) chez les souris contrôles et les souris SLA sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage .n=3, p<0.05, # significativement différent du Sed Control, \* significativement différent entre deux groupes de SLA

Nous avons analysé l'expression de la protéine par WIB d'AMPK et son état de phosphorylation via la Ser172Thr, ainsi que l'expression des transcrits de *Prkaa1* et *Prkaa2* par RT-qPCR sur les *tibialis* des souris contrôles et des souris SLA sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage, à P115.





L'analyse de l'expression d'AMPK met en évidence une augmentation de la phosphorylation dans la SLA qui est maintenue malgré l'exercice physique (Figure 8 A). L'étude transcriptionnelle permet de différencier l'expression des deux sousunités d'AMPK. On observe ainsi que la sous-unité  $\alpha$ 1, codée par *Prkaa1*, ne semble pas être modulée dans la SLA (Figure 8 B) alors que la sous-unité  $\alpha$ 2, codée par *Prkaa2*, est régulée négativement dans la SLA (Figure 8 C). L'exercice de course ne permet qu'une faible augmentation de l'expression de cette sous-unité, tandis que l'exercice de nage ramène les valeurs d'expression au niveau du contrôle (Figure 8 C).

AMPK régule la captation du glucose par phosphorylation de TBC1D1

TBC1D1 (tre-2/USP6, BUB2, cdc16 domain family member 1) est une protéine intervenant dans la localisation subcellulaire de GLUT4, après un exercice physique. Elle est une cible d'AMPK, et permet en collaboration avec AS160 (Akt substrate of 160 kDa) la régulation de la prise de glucose dépendante de l'insuline. Sa phosphorylation permet l'internalisation des transporteurs GLUT4.



Figure 9 : Analyse des transcrits de *Tbc1d1* dans le *tibialis* des souris SOD1(G93A) à P115

Analyse par RT-qCR des transcrits de Tbc1d1 des souris contrôles et des souris SLA sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage n=3, p<0.05, # significativement différent du Sed Control, \* significativement différent entre deux groupes de SLA

Nous avons analysé l'expression des transcrits de *Tbc1d1* par RT-qPCR sur le *tibialis* des souris contrôles et des souris SLA sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage, à P115.

L'analyse transcriptionnelle met en évidence une diminution de l'expression de *Tbc1d1* dans le *tibialis* SLA à P115 (Figure 9). L'exercice de course n'engendre pas d'augmentation des transcrits, à l'inverse de l'exercice de nage qui rétablit une expression comparable au contrôle (Figure 9). Ces résultats sont en accord avec les





effets de la nage sur la localisation de GLUT4, une amélioration de la régulation de la localisation subcellulaire.

# Le niveau de glucose cytoplasmique impacte la régulation de la lipogenèse endogène via le facteur de transcription *ChREBP*.

Nous nous sommes intéressés au facteur de transcription *ChREBP* (Carbohydrate-responsive element-binding protein), qui régule l'expression des gènes de la lipogenèse endogène en fonction du taux de glucose cytoplasmique (Benhamed et al., 2013). Lors d'un faible taux de glucose cytoplasmique, *Chrebp* se localise dans le cytoplasme. Une augmentation de glucose cytoplasmique induit sa translocation dans le noyau où il permet d'une part, l'activation de la transcription des gènes de la lipogenèse et, d'autre part, une auto régulation positive, permettant ainsi une augmentation rapide et importante de la lipogenèse (Benhamed et al., 2013).



## Figure 10 : Analyse des transcrits de *Chrebp* dans le *tibialis* des souris SOD1(G93A) à P115

Analyse par RT-qCR des transcrits de Chrebp des souris contrôles et des souris SLA sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage. n=3, p<0.05, # significativement différent du Sed Control, \* significativement différent entre deux groupes de SLA

Nous avons analysé l'expression des transcrits de *Chrebp* par RT-qPCR sur le *tibialis* des souris contrôles et des souris SLA, sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage, à P115. L'analyse transcriptionnelle met en évidence une diminution de l'expression de *Chrebp* dans le *tibialis* SLA à P115 (Figure 10). L'exercice de nage permet de revenir dans des taux d'expression semblables aux contrôles. L'exercice de course ne permet pas de modifications significatives (Figure 10). Ces données sont en accord avec les résultats précédents, indiquant une meilleure tolérance au glucose des souris SLA soumises à l'exercice de nage.





## 2. La biosynthèse du cholestérol est régulée par AMPK via HMGCR.

Le cholestérol est un composé essentiel à la formation des membranes. Quoique sa synthèse soit principalement réalisée dans le foie, chaque tissu est capable de la réaliser.

HMGCR (Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase ou HMG CoA Reductase) est la première enzyme du métabolisme du cholestérol, catalysant la réduction de l'HMG-CoA en mélovate. Elle est rétro régulée par le cholestérol lui-même, lorsque ce dernier est fixé aux LDL.

Le mélovate subit une succession de réactions, permettant d'aboutir à la formation de desmostérol ou de lanostérol. Ces deux molécules sont ensuite réduites en cholestérol, par DHCR24 (24-dehydrocholesterol reductase) aussi connue sous le nom de Seladin1.

Le cholestérol, lorsqu'il est en excès dans les cellules, est exporté pour être redirigé vers le foie via les HDL. Cette sortie est possible grâce à un transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette 1) aussi connu sous le nom de CERP (cholesterol efflux regulatory protein).



Figure 11 : Analyse des transcrits des enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse du cholestérol dans le *tibialis* des souris SOD1(G93A) à P115

Analyse par RT-qCR des transcrits de Hmgcr (A), Dhcr24 (B) ou Abca1 (C) des souris contrôles et les souris SLA sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage. n=3, p<0.05, # significativement différente du Sed Control, \* significativement différent entre deux groupes de SLA





Nous avons analysé l'expression des transcrits de *Hmgcr*, *Dhcr24*, et *Abca1* par RT-qPCR sur le *tibialis* des souris contrôles et des souris SLA, sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage, à P115.

Dans le *tibialis* SLA, le niveau des transcrits de *Hmgcr* et *Dhcr24* est diminué (Figure 11 A, B). Les exercices de course et de nage permettent une augmentation du niveau des transcrits de *Hmgcr* (Figure 11 A) et de *Dhcr24* (Figure 11 B). L'analyse de l'expression des transcrits de *Abca1* ne présente pas de différence quelles que soient les conditions (Figure 11 C).

Ces données suggèrent une altération de la biosynthèse du cholestérol dans la SLA ; l'exercice de nage semble le plus adapté pour permettre une restauration de l'expression de l'ensemble des tanscrits.





## 3. L'exercice physique active PGC1α par modulation de l'activité d'AMPK.

PGC1 $\alpha$  (peroxysome proliferator activator receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) est un facteur de transcription, impliqué dans le métabolisme énergétique (Tiraby and Langin, 2005). Il est particulièrement exprimé dans certains types de tissus dont les muscles squelettiques. PGC1 $\alpha$  est un activateur de la biosynthèse mitochondriale, de l'oxydation des acides gras, notamment en stimulant l'expression de CPT1. Il va permettre la transition des fibres de type II en fibres de type I, la régulation du taux de cholestérol et l'augmentation du transport du glucose. Ce facteur de transcription, intervenant dans de nombreuses étapes clés du métabolisme, est stimulé lors des exercices physiques d'endurance.



Figure 12 : Analyse des transcrits de Pgc1a dans le *tibialis* des souris SOD1(G93A) à P115

Analyse par RT-qCR des transcrits de PGC1 $\alpha$  des souris contrôles et des souris SLA sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage. n=3, p<0.05, # significativement différent du Sed Control, \* significativement différent entre deux groupes de SLA

Nous avons analysé l'expression des transcrits de *Pgc1α* par RT-qPCR dans le *tibialis* des souris contrôles et des souris SLA sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage à P115.

L'analyse de l'expression de Pgc1a dans le *tibialis* SLA à P115 montre une diminution significative des transcrits (Figure 12). Les deux types d'exercices induisent une augmentation de l'expression de Pgc1a dans le *tibialis* SLA (Figure 12), mais avec des efficacités différentes. L'exercice de course induit un niveau intermédiaire, l'augmentation des transcrits n'étant pas assez importante pour qu'il y ait une différence significative avec le *tibialis* SLA, mais cela le rapproche suffisamment du témoin, pour que la diminution ne soit plus significative. L'exercice de nage, quant à lui permet une expression transcriptionelle semblable au contrôle.





### AMPK a un impact indirect sur la production d'irisine : PGC1 $\alpha$ régule la transcription de FNDC5.

Ces dernières années, il a été mis en évidence une molécule, libérée exclusivement lors d'exercice physique, et elle serait à l'origine de nombreuses modulations (Boström et al., 2012). Celle-ci, assimilée à une hormone, est nommée irisine. Elle se présente sous forme de précurseur, FNDC5, avant d'être clivée et libérée dans l'organisme. La transcription de FNDC5 est dépendante de PGC1α.







Analyse par RT-qCR des transcrits de Fndc5 des souris contrôles et les souris SLA sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage. n=3, p<0.05, # significativement différent du Sed Control, \* significativement différent entre deux groupes de SLA

Nous avons analysé l'expression des transcrits de *Fndc5* par RT-qPCR dans le *tibialis* des souris contrôles et des souris SLA sédentaires ou entraînées à la course ou à la nage, à P115.





Dans le *tibialis* SLA, l'expression de FNDC5 est significativement diminuée (Figure 14). Quel que soit le type d'exercice, une augmentation des transcrits est observée (Figure 14), mais elle est significativement plus importante avec l'exercice de nage.





#### **4.**Conclusion

La phosphorylation d'AMPK traduit l'activité de cette protéine. Nous avons montré, dans le *tibialis* des souris SOD1(G93A), une augmentation de la phosphorylation d'AMPK, comme cela a déjà été démontré dans le cerveau, la moelle épinière et les muscles (Zhao et al., 2015).

Cependant l'étude transcriptionnelle des deux sous-unités nous permet de différencier l'état de phosphorylation général et l'activité plus spécifique des sousunités catalytiques. La sous-unité α1 ne semble pas être affectée par la pathologie, cependant la diminution d'expression des transcrits de la sous-unité α2 permet de comprendre pourquoi un modèle souris KO pour cette sous-unité ne permet pas de changer la course des symptômes des souris SOD1(G93A). Les altérations d'expression de la sous-unité α2, majoritaire dans le muscle, suggèrent un défaut d'action d'AMPK sur la régulation du métabolisme énergétique. L'ensemble de l'étude transcriptionnelle sur les protéines, directement ou indirectement régulées par AMPK, renforce cette hypothèse. Dans la SLA, l'étude des hétérotrimères d'AMPK et des voies de signalisation qu'ils activent, pourrait donner des éléments de réponse sur les actions contradictoires des drogues utilisées.

L'exercice physique, aussi bien l'exercice de course que l'exercice de nage, semble moduler l'expression de la sous-unité  $\alpha 2$  d'AMPK. Cependant, seul l'exercice de nage permet, sur l'ensemble des gènes analysés, un niveau d'expression des transcrits au moins équivalent au contrôle. L'expression de PGC1 $\alpha$  dépend de l'intensité de l'exercice physique. Ainsi comme attendu, l'exercice de nage semble plus intense que l'exercice de course, permettant une augmentation plus importante de FNDC5. Ce dernier est clivé puis libéré dans le système sanguin pour agir telle une hormone. Un traitement au FNDC5 pourrait être une cible thérapeutique dans la SLA. En effet, l'injection d'irisine dans un modèle murin de diabète de type 2, permet une augmentation de la captation du glucose et une stimulation du métabolisme lipidique (Xin et al., 2015).

En parallèle des défauts métaboliques observés, l'altération d'AMPK suggère une modulation de la biosynthèse du cholestérol, composé important de la membrane cellulaire. Or, un défaut dans la composition même de la structure





membranaire pourrait induire de nombreuses modulations du métabolisme énergétique (Grey 1984, Fu 2014).

Ainsi, dans notre modèle souris SOD1(G93A), l'exercice de nage semble améliorer l'expression de certaines sous-unités catalytiques, suggérant une amélioration du métabolisme énergétique, dépendant d'AMPK. L'autophagie, proposée comme nécessaire à l'amélioration du métabolisme énergétique après un exercice de nage (Desseille, soumis), est en partie régulée par AMPK via la phosphorylation de ULK1/2. Les données suggèrent que l'exercice physique, par son action sur l'autophagie et *Prkaa1*, semble améliorer de nombreuses voies de signalisation, altérées dans la SLA.















## **10.Discussion**

La relation entre le métabolisme énergétique et la neuroprotection n'était pas particulièrement étudiée dans le cas de modèle murin de SLA. L'ensemble des résultats suggère une amélioration du métabolisme énergétique dans les souris SLA entraînées à la nage, et une implication de l'autophagie.

## 1. Altération du métabolisme énergétique dans le modèle souris SOD1(G93A)

L'analyse de l'altération du métabolisme se place dans un contexte particulier autour de la SLA. L'apport bénéfique de l'exercice physique est controversé, mais à l'issue d'un premier travail concluant à un effet de neuroprotection de la nage (Deforges et al., 2009), l'hypothèse, que certains types d'exercice physique pourraient être bénéfiques dans le modèle SOD1(G93A), s'est posée.

Il a été montré une relation entre le métabolisme énergétique et le maintien des jonctions neuromusculaires (Moruzzi and Bergamini, 1983). Or le maintien de la JNM peut permettre la neuroprotection. Ainsi, dans la SLA, la dénervation étant un des phénomènes précoces dans le modèle SOD1(G93A) (Vinsant et al., 2013a), une amélioration du métabolisme énergétique pourrait être bénéfique et possiblement induire la neuroprotection observée à l'issue d'un exercice de nage.

Nos résultats suggèrent une altération du métabolisme énergétique dans la SLA. De nombreuses données de la littérature mettent en évidence une diminution des réserves lipidiques des souris SLA, et une utilisation préférentielle de cette ressource (Dupuis et al., 2004; Piquet, 2006). Ainsi dans le modèle SOD1(G93A) nous retrouvons ce résultat, sans toutefois, observer de stéatose hépatique (Finkelstein et al., 2011) restant fidèle à la pathologie humaine (Dupuis et al., 2008).

Nous nous sommes donc intéressés à certaines étapes du métabolisme énergétique. Pour permettre l'étude de l'utilisation du glucose, nous avons analysé l'expression et la localisation de GLUT4, transporteur majoritaire du glucose dans les




muscles squelettiques, ainsi que l'expression transcriptionnelle et protéique de la GAPDH, enzyme de la glycolyse hautement conservée, et l'analyse de l'état de phosphorylation de la PDH, enzyme permettant le passage du pyruvate dans la mitochondrie. De plus, nous avons observé le devenir du pyruvate par l'analyse de la concentration de lactate et la capacité d'activation de la cytochrome oxydase. En parallèle, nous avons analysé, d'une part le niveau transcriptionnel de nombreuses protéines intervenant dans la régulation du métabolisme lipidique, et d'autre part, la concentration de triglycérides dans le muscle des souris SOD1(G93A). Enfin, nous nous sommes intéressés à l'état d'activation de l'autophagie et à sa fonctionnalité.

Lorsque nous nous sommes intéressés au métabolisme du glucose, la diminution des transcrits de Glut4, ainsi que son défaut de localisation sont en accord avec la résistance au glucose observée dès P70. Or dans la littérature, il a été montré une absence ou une diminution de la résistance au glucose dans le même modèle souris (Dupuis et al., 2004; Smittkamp et al., 2014). Cependant les souris analysées, dans le cadre de notre étude, semblent avoir une pathologie plus sévère avec une perte de poids significativement plus importante. D'autre part, la résistance au glucose a été réalisée après une période de jeûne de 4h durant la période de repos. Dans le cas de l'étude réalisée par Smittkamp, la période de jeûne est de 12h durant la période d'activité. L'ensemble des données, physiologiques (tolérance au glucose, concentration de lactacte) et moléculaires (GAPDH, GLUT4) va dans le sens d'une résistance au glucose, comme cela a pu être observée chez l'homme (Poulton and Rossi, 1993; Pradat et al., 2010). De plus, certains gènes, comme Chrebp, dont la transcription dépend du taux de glucose intracellulaire, sont diminués (Benhamed et al., 2013). Cela confirme que dans le modèle souris SOD1(G93A), au niveau du tibialis à P115, le niveau de glucose capté par le muscle semble relativement faible comparé aux témoins.

Au niveau lipidique, une importante diminution est aussi observée. La lipogenèse est en partie dépendante du taux de glucose (Benhamed et al., 2013). Le niveau de triglycéride dans le *tibialis* se trouve fortement diminué, suggérant une utilisation des lipides sans possibilité de stockage. Deux récepteurs participent à l'entrée des TG dans la cellule : VLDLR (Yagyu et al., 2002) et CD36 (McFarlan et al., 2012). L'expression des transcrits de VLDLR est diminuée et est inchangée pour CD36. L'expression des facteurs de transcription, des gènes codant pour la





lipogenèse tels que *Fas*, *Chrebp*, *Srebp*, présente des niveaux d'expression très bas dans les muscles SLA comparés aux muscles contrôles (diminution de plus de 60%). La majeure partie des acides gras utilisés par la cellule, semble être extracellulaire. Deux origines sont possibles : une origine alimentaire ou une origine endogène (production d'AG dans le foie).

Les AG sont captés par la cellule musculaire et peuvent être : soit oxydés, au niveau de la mitochondrie pour permettre la production d'acétyl-CoA, soit stockés dans le cytoplasme. Or dans le modèle souris SOD1(G93A), de nombreuses études ont mis en évidence une vacuolisation mitochondriale (Jaarsma et al., 2000). En phase terminale de la pathologie, la capacité mitochondriale à réaliser les activités métaboliques, est donc intrinsèquement altérée, et cela indépendamment de la disponibilité en substrat. Dans notre étude, nous montrons une altération des activités de la citrate synthase et de la cytochrome oxydase (enzymes intervenant respectivement dans le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire), en accord avec la littérature dans le modèle SOD1(G93A) (Kirkinezos et al., 2003). De plus, nous avons rapporté des défauts mitochondriaux au niveau des transcrits, notamment une chute de l'expression de UCP3 dans le *tibialis* des souris SLA comparées aux souris contrôles.

Ainsi, l'ensemble des données de notre étude, associé aux données de la littérature, suggèrent fortement une altération du métabolisme dans le muscle SLA, induisant un déficit énergétique.

Lors d'une carence en énergie, la cellule active un processus de dégradation protéique, l'autophagie, pour permettre de combler le déficit énergétique (Masiero et al., 2009). Nous nous sommes donc intéressés à l'expression des gènes de l'autophagie dans le *tibialis* des souris SLA et contrôles. Cette étude a été réalisée à différents niveaux de ce processus, en amont via l'analyse de l'expression de *Bcl2* et *Beclin1*, lors de l'initiation via l'expression de LC3B et P62. Quel que soit le niveau considéré, il semble y avoir une altération de l'autophagie.

Dans les souris SLA, une diminution de l'ensemble des transcrits des protéines intervenant dans l'autophagie et l'augmentation de la quantité de protéines LC3B suggèrent un défaut de fonctionnement de l'autophagie. L'analyse de la disruption du LC3B renforce l'hypothèse d'une activation de l'autophagie. Des résultats préliminaires d'un immunomarquage ciblant LC3B et la cathepsine D





(protéine de la membrane interne du lysosome) renforcent l'idée de l'accumulation des autophagosomes dans le *tibialis* des souris SLA (données non montrées, n=2) et une diminution de la fusion aux lysosomes (données non montrées, n=2). Il semblerait que l'altération de l'autophagie induise une accumulation des autophagosomes et des protéines mal conformées. La diminution de l'expression des transcrits suggèrent un rétrocontrôle négatif sur la transcription des gènes de l'autophagie. Or dans les muscles des souris SOD1(G93A), il ne semble pas y avoir d'agrégats de la protéine SOD1 mutée, à l'inverse de la moelle (Wei et al., 2013). Cela suggère une altération de l'autophagie dans l'ensemble des tissus du modèle SOD1(G93A) ; de plus dans la littérature, des publications mettent en évidence des altérations de l'autophagie dans la SLA, aussi bien chez les souris que chez les drosophiles (Jain et al., 2015; Lee et al., 2015).

L'ensemble de ces processus (métabolisme glucidique, lipidique et autophagie) a un facteur commun en amont de leur régulation : AMPK (Hardie and Pan, 2002). Cette enzyme, dont l'activité est dépendante du ratio AMP/ATP, intervient dans un nombre très élevé de voies de signalisation. Elle est composée de sous-unités catalytiques et de sous-unités régulatrices. Suivant sa composition elle intervient préférentiellement dans l'une ou l'autre des voies de régulation. Ainsi, elle peut inhiber l'autophagie par stimulation de mTOR, elle régule la translocation de GLUT4 à la membrane, par phosphorylation de TBC1D1, elle inhibe la lipogenèse et stimule l'oxydation des AG. Elle intervient aussi dans la biosynthèse mitochondriale et joue un rôle dans la voie de biosynthèse du cholestérol (Mounier et al., 2015). Nous avons donc, analysé le profil d'activation d'AMPK dans le *tibialis* des souris SLA et contrôles à P115.

Le niveau de phosphorylation d'AMPK, traduisant son niveau d'activité, est augmenté. Cependant, la structure hétérotrimérique d'AMPK permet, suivant la répartition de ses sous-unités, de réguler certaines des voies de signalisation (Mounier et al., 2015). Une analyse transcriptionnelle, des deux isoformes de la sous-unité catalytique alpha, suggère une altération spécifique de *Prkaa2* (diminution de l'expression de plus de 70%) dans le *tibialis* des souris SLA. *Prkaa1*, quant à lui, ne semble pas être affecté dans le *tibialis* SLA.

Or, Prkaa2 intervient dans le métabolisme lipidique et dans la voie de biosynthèse du cholestérol (Spencer-Jones et al., 2006). La quantité de protéine de





la sous-unité catalytique n'est pas modulée dans la SLA, mais est significativement plus phosphorylée. L'augmentation de la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$ , pourrait provenir du ratio AMP/ATP et l'augmentation de l'expression de *Prkaa1* (Gowans and Hardie, 2014).

AMPK intervenant aussi dans la voie de biosynthèse du cholestérol, nous avons étudié *Hmgcr* et *Dhcr24*. Quelle que soit l'étape dans la chaîne de biosynthèse du cholestérol, l'expression des transcrits des enzymes est diminuée dans la SLA. Seul, le gène codant pour une protéine intervenant dans l'efflux de cholestérol montre un niveau d'expression semblable au contrôle. Quoique moins essentiel dans le métabolisme énergétique, le cholestérol a une grande importance dans la composition et la mobilité membranaire, permettant par exemple, le regroupement de récepteurs et pouvant intervenir dans les réponses à un exercice physique (Lehmann et al., 1997; Nes, 1974).

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'expression de deux facteurs de transcription qui sont fortement modulées avec l'exercice physique : PGC1a (Egan et al., 2010) et *Fndc5* (Tsuchiya et al., 2015; Xiong et al., 2015). Ils montrent une diminution des transcrits d'au moins 60% dans le *tibialis* SLA. Ces deux facteurs de transcription servent de lien entre la stimulation musculaire et la modulation du métabolisme énergétique. Ainsi, il est intéressant de voir comment l'intensité d'un exercice physique peut faire varier le niveau transcriptionnel : les différences d'effets, des deux exercices physiques, suggèrent des adaptations dans la transcription de nombreux autres gènes du métabolisme énergétique régulés par ces deux facteurs de transcription.

Les souris SLA souffrent d'une altération du métabolisme énergétique (Dupuis et al., 2004; Palamiuc et al., 2015; Perera et al., 2014). Or, l'énergie est nécessaire au maintien de la JNM et à la communication au sein de l'unité motrice. Les analyses des transcrits de *Musk*, *RAcha* et *RAchɛ*, protéines de la JNM, suggèrent un processus de dénervation dans les muscles de souris SOD1(G85R) (Palamiuc et al., 2015). L'analyse des transcrits de ces protéines, dans le modèle SOD1(G93A) suggère une dénervation importante dans le *tibialis* (données non montrées).

Ainsi, dans le *tibialis* des souris SOD1(G93A), nous avons mis en évidence une altération du métabolisme énergétique et de la localisation des transporteurs du



glucose. Malgré l'absence de quantification intrinsèque du glucose, l'ensemble des biomarqueurs suggèrent un déficit énergétique important.

PARIS DESCARTES

La diminution du poids des souris SLA, au cours de la pathologie, est une indication de l'utilisation des réserves énergétiques disponibles et de leur épuisement. Notre étude indique, que dès P70, c'est-à-dire en phase pré symptomatique, le défaut d'utilisation des ressources glucidiques dans les souris SLA, est déjà présent. En effet, la résistance au glucose, dans les souris SOD1(G93A), peut être enregistrée et le niveau des transcrits pour GLUT4 et GAPDH est déjà abaissé à P70. Le poids des souris est significativement différent à P70 mais continue de diminuer jusqu'à P115. Malgré la dénomination de phase pré symptomatique, car la paralysie n'est pas encore visible à P70, les altérations métaboliques sont déjà présentes avec une aggravation de la résistance au glucose, une baisse de l'expression de GAPDH et GLUT4 et une perturbation de l'autophagie.

De manière importante, les données moléculaires, que nous rapportons dans le *tibialis* des souris SOD1(G93A) sont retrouvées dans le muscle des patients SLA.

L'analyse des transcrits de *GLUT4* et *GAPDH* dans des muscles de deltoïdes ou d'anconés, a permis de mettre en évidence que les patients SLA présentent eux aussi, une diminution des transcrits codant pour ces protéines. Le niveau de GLUT4 musculaire ne peut pas servir de biomarqueur de la SLA car d'autres pathologies peuvent avoir un niveau diminué sans pour autant avoir un spectre symptomatique aussi grave que la SLA (Zhang 2009). Cependant il pourrait correspondre à un biomarqueur indicatif de l'état d'avancement de la pathologie en amont de la paralysie musculaire (données non montrées).

Le tableau comparatif entre la souris sédentaire SLA et contrôle permet de connaître l'état métabolique des souris avant le protocole d'entraînement.



## 2. Amélioration du métabolisme énergétique dans les souris SOD1(G93A) entraînées à la nage

Un des objectifs principaux de cette thèse, est d'évaluer l'impact différentiel des deux différents types d'exercices sur les modulations du métabolisme énergétique.

Nous comparons ainsi deux exercices aux caractéristiques bien différentes. Un exercice de course sur tapis roulant, d'intensité modérée, stimule plus particulièrement les unités motrices résistantes et les fibres musculaires I et IIa, les moins affectées dans la pathologie (Grondard et al., 2008). Ainsi ces muscles stimulés ont une majorité de fibres musculaires de type I ou IIa, qui sont fortement vascularisés permettant un apport d'oxygène nécessaire à la glycolyse aérobie. Ces fibres musculaires font partie intégrante des unités motrices S et FR qui correspondent aux unités motrices encore présentes dans la phase terminale de la pathologie (Saxena et al., 2009). L'utilisation de la glycolyse aérobie entraîne la production d'espèces réactives de l'oxydation (ROS) déjà en excès dans le muscle SLA (Capitanio et al., 2012).

Et le second, un exercice de nage à contre-courant (Grondard et al., 2008), exercice de forte intensité permet la stimulation des unités motrices rapides, et donc des fibres IIx-IIb, utilisant préférentiellement une glycolyse anaérobie. Cette voie énergétique entraîne un déchet métabolique : le lactate. Cet exercice de forte intensité permet la stimulation des unités motrices FF, les plus touchées dans la SLA (Saxena et al., 2009). Une étude du *tibialis*, muscle majoritairement composé de fibres rapides, permet d'observer l'impact des deux exercices sur le métabolisme énergétique.

Les premières données de l'impact de ces exercices, sur le modèle souris SOD1(G93A), montrent une amélioration de la durée de vie à l'issue de l'exercice de nage associée à une neuroprotection significative au niveau des MN lombaires, et au maintien du phénotype musculaire (Deforges et al., 2009). Cette thèse se place dans



la continuité de ces travaux de recherche, vise à comprendre l'impact des adaptations du métabolisme énergétique de chaque exercice dans la neuroprotection.

PARIS DESCARTES

Les données sur le métabolisme global mettent en évidence un apport bénéfique de l'exercice de nage mais pas de l'exercice de course. Quoique réaliser un exercice physique est très énergivore (Schmidt-Nielsen, 1972; Weiss and Karpovich, 1946), les souris SLA entraînées à la nage ont une augmentation de leur poids et du stockage des graisses dans les adipocytes. Ces résultats suggèrent que, malgré l'utilisation des ressources énergétiques durant les entraînements, le métabolisme est amélioré. Le poids des souris SLA entraînées à la course n'est pas significativement différent des souris SLA. L'activité de course nécessite une demande importante en calorie (Schmidt-Nielsen, 1972; Weiss and Karpovich, 1946). L'absence de diminution de poids soulève l'hypothèse d'une faible amélioration des réserves énergétiques, après un exercice de course. Ce dernier semble en effet moduler certains paramètres cellulaires (expression de *Gapdh, Fndc5*), mais une diminution beaucoup plus importante des adipocytes de larges sections au profit d'adipocytes de très faibles sections suggère une augmentation plus importante de l'utilisation des lipides.

Une analyse des sérums de chaque groupe de souris a permis de mettre en évidence une diminution du lactate circulant dans la SLA sédentaire et entraînée à la course, tandis que l'exercice de nage permet une augmentation du taux de lactate sanguin, allant même au-delà du niveau du contrôle. L'ensemble de ces données suggère l'utilisation de voies cataboliques différentes (Grondard et al., 2008). L'exercice de course, avec la diminution des adipocytes et l'absence d'augmentation de lactate sanguin, semble préférentiellement utiliser un métabolisme oxydatif en utilisant comme ressource principale les acides gras. L'exercice de nage semble utiliser préférentiellement un métabolisme glycolytique anaérobie, comme il a déjà été rapporté chez l'homme (Chen et al., 2003; Karamouzis et al., 2002). Compte tenu du fait que la SLA est caractérisée par un hypermétabolisme d'origine lipidique, l'exercice de nage semble être plus adapté, permettant l'utilisation d'une ressource non exploitée.

Nous avions précédemment observée une résistance au glucose dans les souris SLA, dès P70, en phase pré-symptomatique. Or, les entraînements





commencent au même moment, suggérant que les modifications observées sont le résultat d'une amélioration du métabolisme énergétique et non d'un maintien de l'état des souris SLA. A l'issue de l'exercice de course, la captation du glucose est semblable aux souris SLA sédentaires. Après un exercice de nage, la captation du glucose par les souris SLA suit une courbe semblable à celle des souris contrôles sédentaires. Ainsi, au contraire de la course, l'exercice de nage pourrait rétablir l'utilisation du glucose par les tissus.

Nous nous sommes donc intéressés au métabolisme musculaire en étudiant le *tibialis*, un muscle rapide très touché dans la SLA (Hegedus et al., 2007). A la suite de l'exercice de course, on met en évidence une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *Fndc5* et de *Pgc1a*, ce qui est en accord avec une augmentation de l'activité musculaire du *tibialis*, lors de cet exercice. Au niveau métabolique, peu de facteurs sont modulés. Une augmentation significative, entre la SLA sédentaire et la SLA entraînée à la course, est observable au niveau des transcrits de *Prkaa2*, *Lc3b*, *Gapdh* et *Fas*. L'expression de GAPDH est augmentée, que ce soit au niveau protéique ou transcriptionnel, suggérant une amélioration du métabolisme glucidique aérobie. D'autre part, les activités enzymatiques de la CS et de la COX sont augmentées, suggérant une stimulation du cycle de Krebs à l'issue de la glycolyse aérobie. Ainsi pris dans leur ensemble, l'exercice de course ne semble pas induire de modulations suffisantes pour permettre une amélioration de l'état général des souris SLA.

Avec l'entraînement à la nage, l'expression de *Fndc5* et de *Pgc1a* est fortement augmentée, au point où les seuils d'expression de ces transcrits égalisent ou dépassent ceux du contrôle. L'ensemble des modulations dues à l'exercice de nage suggère une réutilisation du glucose, comme source d'énergie privilégiée dans les muscles SLA. Les transcrits de *Glut4* et de *Gapdh* sont augmentés à des niveaux comparables à ceux du contrôle, de même que la localisation subcellulaire de GLUT4 à la membrane des fibres musculaires. L'expression protéique de GAPDH est fortement augmentée, suggérant une amélioration de la glycolyse plus importante, pour répondre au besoin énergétique des fibres musculaires. Cette amélioration de la glycolyse semble principalement orientée vers la voie anaérobie. En effet, la nage ne module pas l'expression de *Pdk4*, et ne modifie pas l'état de phosphorylation de la PDH. Il faut cependant, considérer une étude mettant en





évidence des améliorations du métabolisme énergétique, dans la SLA par la régulation de la PDH (Palamiuc et al., 2015), il serait donc intéressant d'entreprendre une étude pour déterminer si une action synergique est possible.

De plus, une élévation de la production de lactate est observée dans la circulation sanguine des souris SLA soumises à la nage. L'augmentation des capacités enzymatiques de la CS et de la COX suggère une amélioration de l'état des mitochondries et une possible augmentation du métabolisme lipidique, fournissant une réponse énergétique plus importante via la béta oxydation. Lorsque nous avons regardé des enzymes clés dans la régulation du métabolisme des lipides, telles que *Fas* ou *Dgat1*, l'ensemble des transcrits, diminués dans la SLA, se retrouvent au niveau du contrôle. Or, il est connu que l'entrée de glucose dans le muscle peut être associée à une augmentation de la lipogenèse endogène. De plus, *Dgat1*, enzyme qui catalyse la formation des TG à partir des diglycérides et de l'acétyl-CoA, est augmentée après un exercice de nage, suggérant un stockage des TG plus important.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure à l'apport bénéfique d'un exercice de nage sur le métabolisme énergétique dans le *tibialis* SLA. On peut alors se poser la question de l'évènement déclencheur, activé par la nage, et qui va induire l'ensemble des améliorations que nous avons rapportées ici.

En 2013, une étude met en évidence une glycolyse au niveau du trafic vésiculaire (Zala et al., 2013). Le défaut d'utilisation du glucose, par les muscles SLA, pourrait altérer le trafic vésiculaire, et altérer le bon déroulement de l'autophagie. L'hypothèse, d'un cercle vertueux avec l'entrée du glucose qui permet le trafic vésiculaire nécessaire à la translocation de GLUT4 à la membrane, peut être envisagée. D'autre part, une seconde équipe travaillant sur la protéine *Bcl2*, montre via un modèle KO pour le gène *Bcl2*, que l'exercice physique induit la stimulation de l'autophagie par une voie différente du jeûne ou de la carence alimentaire (He et al., 2012). L'amélioration du trafic vésiculaire, dans la SLA entraînée à la nage, pourrait provenir d'une amélioration de l'autophagie, désencombrant ainsi la cellule des agrégats protéiques.

L'analyse de l'expression des transcrits des protéines de l'autophagie, montre un effet différent entre les deux types d'exercices. Suite à un exercice de course, les niveaux de transcrits des protéines de l'autophagie sont à des niveaux comparables



à ceux de la SLA, tandis que l'exercice de nage permet une augmentation des transcrits à des niveaux comparables aux contôles.

PARIS DESCARTES

Certains défauts d'expression, des gènes liés au métabolisme du glucose, tels que *Glut4* ou *Gapdh*, sont déjà présents à P70. De manière intéressante, nous avons observé que les modulations transcriptionnelles étaient rapides. En effet, seulement trois jours de nage suffisent pour obtenir des niveaux d'expression semblables au contrôle. Ces données sont en accord avec des études précédentes, qui ont montré qu'un unique exercice permet de moduler l'expression transcriptionnelle de certaines protéines dans le muscle du rat (McKenzie and Goldfarb, 2007).

A P70, les souris SOD1(G93A) présentent un défaut d'expression des gènes du métabolisme glucidique (GLUT4, GAPDH) mais ne présentent pas d'altération de l'expression des gènes étant impliqués dans l'autophagie (*Lc3b, P62, Bcl2, Beclin1*) (données non montrées). Pour permettre l'étude de l'autophagie, dans l'amélioration du métabolisme énergétique, nous avons utilisé deux drogues inhibant des étapes clés de l'autophagie : la fusion et la dégradation lysosomale (3-MA ou chloroquine).

Nous avons pu mettre en évidence, que bloquer le processus d'autophagie, inhibe les effets de l'exercice de nage sur l'expression des transcrits de GLUT4 et de GAPDH. Les effets transcriptionnels de la nage, nécessitent une activation des processus de l'autophagie, qui ne semblent pas être altérés à P70.

Il semblerait donc, que les améliorations, obtenues grâce à l'exercice de nage, soient possibles avec la participation de l'autophagie. Les agrégats protéiques observés dans la SLA (Lee et al., 2015) encombreraient la cellule, et un défaut d'entrée du glucose, diminuerait le trafic vésiculaire entraînant ainsi une altération de l'ensemble du métabolisme énergétique. Avec l'ensemble de ces résultats, on peut proposer le schéma suivant : 1- défaut d'entrée du glucose ; 2-altération de l'autophagie ; 3- altération du trafic vésiculaire (GLUT4 cytoplasmique) ; 4- augmentation de l'intolérance au glucose et altération du métabolisme énergétique.

Pour tenter d'aller plus loin dans l'analyse des mécanismes potentiellement impliqués, nous avons étudié AMPK. Cette enzyme est connue pour intervenir dans de nombreuses voies de signalisation (paragraphe AMPK), et son activité est régulée par le ratio ATP/AMP. On pourrait donc s'attendre, dans la SLA, à une forte concentration d'AMP et une faible concentration d'ATP, induisant l'activation





d'AMPK. Et à l'issue d'un exercice de nage, avec l'augmentation du métabolisme énergétique, le taux d'ATP devrait être augmenté et pourrait induire une diminution de l'activation d'AMPK.

Lors de l'étude de la phosphorylation d'AMPK, nos résultats ne montrent pas de différences significatives, dans le *tibialis* des souris SLA sédentaires et entraînées à la nage. Cependant, l'augmentation de phosphorylation, observée dans les souris SLA entraînées à la nage, n'est pas corroborée par l'analyse transcriptionelle des sous-unités catalytiques. De nombreuses études du métabolisme mettent en évidence une relation entre des défauts énergétiques et des altérations dans le fonctionnement d'AMPK dans la SLA (Perera et al., 2014). Il serait donc intéressant d'approfondir les données autour d'AMPK, notamment sur sa composition hétérotrimérique (Mounier et al., 2015) et sa spécificité d'action. Etant une des rares enzymes participant à l'ensemble des altérations observées (lipides, glucides, cholestérol, autophagie), améliorer l'expression et la régulation d'AMPK pourrait être une orientation possible pour améliorer le métabolisme énergétique musculaire dans la SLA (Perera et al., 2014).







Les ressources utilisées pour pallier à l'augmentation de la demande énergétique semblent emprunter les mêmes voies utilisées dans la SLA (Dupuis et al., 2004). En effet, le défaut d'utilisation du glucose induit une utilisation préférentielle des lipides, et l'exercice de course induit un métabolisme principalement oxydatif. Ne pouvant fournir du glucose pour la glycolyse aérobie, les ressources utilisées seraient donc les lipides encore disponibles. Si la course permet de faibles améliorations de l'état de santé des souris dans un premier temps, elle risque dans un second temps d'accélérer la pathologie par sa production de radicaux libres. En effet les cellules ne peuvent gérer cet excès de ROS, d'une part, car le système est saturé par la SOD1 mutée, et d'autre part, cette dernière fonctionnant mal, doit être compensée par d'autres enzymes détoxifiantes.

Les muscles squelettiques sont des grands consommateurs de glucose. Lors d'un exercice de résistance, la demande glucidique est très importante car elle constitue une ressource énergétique rapide. Le *tibialis* est un des muscles les plus touchés dans la SLA, et il est, de plus, fortement stimulé lors d'un exercice de nage. La stimulation en résistance du *tibialis* permet à ce dernier d'améliorer son métabolisme énergétique, et de ne pas utiliser les réserves lipidiques. L'amélioration du métabolisme permet le maintien de la jonction neuromusculaire, de la communication entre le muscle et l'axone, et de la stimulation des motoneurones (Taylor et al., 2005). L'ensemble de ces données pourrait expliquer, au moins en partie, la neuroprotection, induite par la nage, des motoneurones de large soma et le maintien des unités motrices FF, les plus altérées dans la pathologie (Deforges et al., 2009; Saxena et al., 2009).

Etant sur des entraînements similaires entre la course et la nage (même durée, même période), seul le type de stimulation musculaire varie. Ainsi l'ensemble des améliorations, telles que le poids, la résistance au glucose ou la durée de vie, serait d dû à l'importance de la stimulation musculaire (Deforges et al., 2009).

L'ensemble des données, suggère que le métabolisme glucidique pourrait être affecté dès la phase asymptomatique et que la stimulation de l'autophagie pourrait





être responsable de l'amélioration observée, à la suite d'un exercice de nage, sur le métabolisme musculaire.

La question du transfert à l'homme de ces données sur les bénéfices induits par un exercice de nage reste ouverte. Dans le cas d'une SLA familiale, si la mutation est détectée avant la phase symptomatique, il serait possible de proposer un programme d'exercice physique adapté. Cependant, la majeure partie des patients ont une SLA sporadique et découvre leur maladie lorsqu'ils présentent déjà des faiblesses musculaires. L'ensemble de notre étude réalisée, avec le début d'entraînement en phase pré symptomatique, ne permet pas d'affirmer qu'un exercice de résistance, en phase symptomatique serait bénéfique.

La SLA est une maladie d'étiologie inconnue. La pluralité des causes ne permet pas, actuellement, de dresser un tableau clinique précis, sur les causes de déclenchement de la maladie. Ainsi, dans un contexte génétique favorable au déclenchement de la maladie, l'exercice physique peut se révéler délétère. Malgré des données encourageantes sur le modèle SOD1(G93A), l'adaptation à l'homme nécessite un approfondissement des connaissances et une caractérisation, plus précise, des exercices physiques potentiellement bénéfiques dans la SLA.







Ce travail amène une première hypothèse mécanistique pour expliquer les bénéfices amenés par un exercice de nage, par rapport à un exercice de course, dans le modèle SOD1(G93A). Au niveau systémique, une augmentation du poids, due à l'augmentation de la masse grasse, semble permettre une amélioration de l'état général des souris (Dupuis et al., 2004). Au niveau cellulaire, dans le muscle rapide, il semble que la nage permette une réutilisation du glucose facilitant ainsi le bon fonctionnement de l'autophagie.

Il serait intéressant de réaliser l'activation de l'autophagie à partir de P70, chez les souris SOD1(G93A), via l'utilisation de drogue telle que la rapamycine (Harada et al., 2008). Cela permettrait de voir l'impact réel qu'induit l'activation de l'autophagie notamment sur la restauration de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose.

## 1. Analyse de la résistance au glucose in vivo sur modèle murin.

Il serait intéressant, de mesure directement, *in vivo*, la captation du glucose chez les souris SLA et contrôles. En effet, nos données sur l'intolérance au glucose sont opposées à celle de la littérature actuelle (Smittkamp et al., 2014). Pour permettre de confirmer l'existence d'une intolérance au glucose dans les souris SOD1(G93A), nous pourrions mesurer la captation, par le muscle, du glucose marqué en imagerie *in vivo* du petit animal. Cette expérience nécessite l'utilisation d'un glucose non métabolisable couplé à une sonde fluorescente. Après injection du glucose dans le milieu sanguin, le niveau de fluorescence musculaire est mesuré et comparé aux données récoltées chez les souris contrôles, SLA, sédentaires ou entraînées. Ces informations permettront d'une part d'appuyer la thèse de l'intolérance au glucose et d'autre part, d'évaluer le degré de captation du glucose en fonction des muscles. Cette étude pourrait permettre d'amener de nouvelles hypothèses concernant la sensibilité préférentielle des unités motrices rapides dans la SLA.





## 2. Quelle est l'origine des acides gras utilisés dans le stockage des triglycérides dans le tibialis SLA après un exercice de nage ?

Les caractéristiques des acides gras sont importantes, car certains vont permettre une production d'énergie plus importante, tandis que d'autre vont générer un nombre plus élevé de ROS. Une analyse lipidomique serait intéressante pour comprendre, si l'exercice de nage permet, seulement, une amélioration quantitative des lipides ou s'il permet aussi une amélioration qualitative. D'autre part, l'organe responsable de la production des AG est le foie. Or si le foie, présente des problèmes de fonctionnement dans la SLA, la quantité et la qualité des lipides peuvent être modulées. Une altération dans la production des lipides peut induire, plus précocement, un déficit énergétique dans l'ensemble de l'organisme. On pourrait donc mener une analyse lipidomique dans le foie, la circulation, les adipocytes et enfin les muscles, afin de mieux comprendre l'origine des AG stockés dans le *tibialis* après un exercice de nage, et savoir si l'exercice est capable d'améliorer le métabolisme lipidique.

## 3. Analyse du trafic cellulaire dans le modèle SOD1(G93A) et impact de l'exercice de nage

Les données présentes dans ce travail, suggèrent que le trafic vésiculaire est altéré dans le muscle des souris SOD1(G93A). Cela est en accord avec la littérature (Nassif et al., 2010). L'exercice de nage pourrait induire une amélioration de la fluidité des vésicules au niveau des fibres musculaires. Il serait intéressant de réaliser des études de trafic vésiculaire, à P70, pour savoir si des problèmes existent avant la phase symptomatique et s'ils précèdent les défauts du métabolisme énergétique dans la SLA.









































Abel, E.L. (2007). Football increases the risk for Lou Gehrig's disease, amyotrophic lateral sclerosis. Percept Mot Skills *104*, 1251–1254.

Abel, O., Powell, J.F., Andersen, P.M., and Al-Chalabi, A. (2012). ALSoD: A user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics. Hum. Mutat. *33*, 1345–1351.

Abhinav, K., Stanton, B., Johnston, C., Hardstaff, J., Orrell, R.W., Howard, R., Clarke, J., Sakel, M., Ampong, M.-A., Shaw, C.E., et al. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis in South-East England: a population-based study. The South-East England register for amyotrophic lateral sclerosis (SEALS Registry). Neuroepidemiology *29*, 44–48.

Adem, A., Ekblom, J., Gillberg, P.G., Jossan, S.S., Höög, A., Winblad, B., Aquilonius, S.M., Wang, L.H., and Sara, V. (1994). Insulin-like growth factor-1 receptors in human spinal cord: changes in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neural Transm. Gen. Sect. *97*, 73–84.

Adlard, P.A., Perreau, V.M., Pop, V., and Cotman, C.W. (2005). Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. J. Neurosci. *25*, 4217–4221.

Afifi, A.K., Aleu, F.P., Goodgold, J., and MacKay, B. (1966). Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *16*, 475–481.

Aggarwal, A., and Shashiraj, null (2006). Juvenile amyotrophic lateral sclerosis. Indian J Pediatr 73, 225–226.

Aggarwal, S.P., Zinman, L., Simpson, E., McKinley, J., Jackson, K.E., Pinto, H., Kaufman, P., Conwit, R.A., Schoenfeld, D., Shefner, J., et al. (2010). Safety and efficacy of lithium in combination with riluzole for treatment of amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Neurol *9*, 481–488.

Alavian, K.N., Dworetzky, S.I., Bonanni, L., Zhang, P., Sacchetti, S., Mariggio, M.A., Onofrj, M., Thomas, A., Li, H., Mangold, J.E., et al. (2012). Effects of dexpramipexole on brain mitochondrial conductances and cellular bioenergetic efficiency. Brain Res. *1446*, 1–11.

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.

Amendola, J. (2008). Développement postnatal d'un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique: Acquisitions sensori-motrices, fonctionnement des réseaux lombaires et caractérisation des propriétés électriques et morphologiques des motoneurones. Université de la Méditerranée-Aix-Marseille II.

Amendola, J., Gueritaud, J.P., Lamotte d'Incamps, B., Bories, C., Liabeuf, S., Allene, C., Pambo-Pambo, A., and Durand, J. (2007). Postnatal electrical and morphological abnormalities in lumbar motoneurons from transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. Arch Ital Biol *145*, 311–323.

Andersen, P.M. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. Curr Neurol Neurosci Rep *6*, 37–46.

Andreadou, E., Kapaki, E., Kokotis, P., Paraskevas, G.P., Katsaros, N., Libitaki, G., Zis, V., Sfagos, C., and Vassilopoulos, D. (2008). Plasma glutamate and glycine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: the effect of riluzole treatment. Clin Neurol Neurosurg *110*, 222–226.

Appel, V., Stewart, S.S., Smith, G., and Appel, S.H. (1987). A rating scale for amyotrophic lateral sclerosis: description and preliminary experience. Ann. Neurol. *22*, 328–333.

Armon, C. (2003). An evidence-based medicine approach to the evaluation of the role of exogenous risk factors in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neuroepidemiology *22*, 217–228.





Armon, C. (2009). Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. Neurology 73, 1693–1698.

Arnold, A.-S., Egger, A., and Handschin, C. (2011). PGC-1 $\alpha$  and myokines in the aging muscle - a mini-review. Gerontology 57, 37–43.

Atkin, J.D., Farg, M.A., Turner, B.J., Tomas, D., Lysaght, J.A., Nunan, J., Rembach, A., Nagley, P., Beart, P.M., Cheema, S.S., et al. (2006). Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. J. Biol. Chem. *281*, 30152–30165.

Bamman, M.M., Ragan, R.C., Kim, J.-S., Cross, J.M., Hill, V.J., Tuggle, S.C., and Allman, R.M. (2004). Myogenic protein expression before and after resistance loading in 26- and 64-yr-old men and women. J. Appl. Physiol. *97*, 1329–1337.

Banerjee, A.K., Mandal, A., Chanda, D., and Chakraborti, S. (2003). Oxidant, antioxidant and physical exercise. Mol. Cell. Biochem. *253*, 307–312.

Beghi, E., Logroscino, G., Chiò, A., Hardiman, O., Mitchell, D., Swingler, R., Traynor, B.J., and EURALS Consortium (2006). The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. Biochim. Biophys. Acta *1762*, 1150–1157.

Bello-Haas, V.D., Florence, J.M., Kloos, A.D., Scheirbecker, J., Lopate, G., Hayes, S.M., Pioro, E.P., and Mitsumoto, H. (2007). A randomized controlled trial of resistance exercise in individuals with ALS. Neurology *68*, 2003–2007.

Benhamed, F., Poupeau, A., and Postic, C. (2013). [The transcription factor ChREBP: a key modulator of insulin sensitivity?]. Med Sci (Paris) 29, 765–771.

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. Lancet Neurol 2, 656–657.

Bergemalm, D., Jonsson, P.A., Graffmo, K.S., Andersen, P.M., Brännström, T., Rehnmark, A., and Marklund, S.L. (2006). Overloading of stable and exclusion of unstable human superoxide dismutase-1 variants in mitochondria of murine amyotrophic lateral sclerosis models. J. Neurosci. *26*, 4147–4154.

Bergemalm, D., Forsberg, K., Srivastava, V., Graffmo, K.S., Andersen, P.M., Brännström, T., Wingsle, G., and Marklund, S.L. (2010). Superoxide dismutase-1 and other proteins in inclusions from transgenic amyotrophic lateral sclerosis model mice. J. Neurochem. *114*, 408–418.

Bhattacharya, A., Bokov, A., Muller, F.L., Jernigan, A.L., Maslin, K., Diaz, V., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2012). Dietary restriction but not rapamycin extends disease onset and survival of the H46R/H48Q mouse model of ALS. Neurobiol. Aging *33*, 1829–1832.

Bigio, E.H. (2011). C9ORF72, the new gene on the block, causes C9FTD/ALS: new insights provided by neuropathology. Acta Neuropathol. *122*, 653–655.

Bilic, E., Bilic, E., Rudan, I., Kusec, V., Zurak, N., Delimar, D., and Zagar, M. (2006). Comparison of the growth hormone, IGF-1 and insulin in cerebrospinal fluid and serum between patients with motor neuron disease and healthy controls. Eur. J. Neurol. *13*, 1340–1345.

Van Blitterswijk, M., Gulati, S., Smoot, E., Jaffa, M., Maher, N., Hyman, B.T., Ivinson, A.J., Scherzer, C.R., Schoenfeld, D.A., Cudkowicz, M.E., et al. (2011). Anti-superoxide dismutase antibodies are associated with survival in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler *12*, 430–438.





Blokhuis, A.M., Groen, E.J.N., Koppers, M., Van den Berg, L.H., and Pasterkamp, R.J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol. *125*, 777–794.

Blommaart, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelárová, H., and Meijer, A.J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. Eur. J. Biochem. *243*, 240–246.

Boillée, S., Vande Velde, C., and Cleveland, D.W. (2006). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. Neuron *52*, 39–59.

Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., et al. (2012). A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. Nature *481*, 463–468.

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.

Bray, M.S. (2000). Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. J. Appl. Physiol. *88*, 788–792.

Brekke, E., Morken, T.S., and Sonnewald, U. (2015). Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain. Neurochem. Int. *82*, 33–41.

Brooks, B.R. (1994). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. J. Neurol. Sci. *124 Suppl*, 96–107.

Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., Munsat, T.L., and World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord. *1*, 293–299.

Browne, S.E., Bowling, A.C., Baik, M.J., Gurney, M., Brown, R.H., and Beal, M.F. (1998). Metabolic dysfunction in familial, but not sporadic, amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurochem. *71*, 281–287.

Browne, S.E., Yang, L., DiMauro, J.-P., Fuller, S.W., Licata, S.C., and Beal, M.F. (2006). Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. Neurobiol. Dis. *22*, 599–610.

Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., and Cleveland, D.W. (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. Science *281*, 1851–1854.

Brusa, L., Bassi, A., Stefani, A., Pierantozzi, M., Peppe, A., Caramia, M.D., Boffa, L., Ruggieri, S., and Stanzione, P. (2003). Pramipexole in comparison to I-dopa: a neuropsychological study. J Neural Transm *110*, 373–380.

Bucchia, M., Ramirez, A., Parente, V., Simone, C., Nizzardo, M., Magri, F., Dametti, S., and Corti, S. (2015). Therapeutic development in amyotrophic lateral sclerosis. Clin Ther *37*, 668–680.

Burke RE (1994). Physiology of motor units. (In: Myology (Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds), pp 464–484. New York: McGraw-Hill),.

Camu, W., Khoris, J., Moulard, B., Salachas, F., Briolotti, V., Rouleau, G.A., and Meininger, V. (1999). Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. French ALS Research Group. J. Neurol. Sci. *165 Suppl 1*, S21–26.





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 Res. *676*, 25–40.

Dal Canto, M.C., and Gurney, M.E. (1997). A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol. *93*, 537–550.

Capitanio, 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.

Carling, D., Thornton, C., Woods, A., and Sanders, M.J. (2012). AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? Biochem. J. 445, 11–27.

Carreras, I., Yuruker, S., Aytan, N., Hossain, L., Choi, J.-K., Jenkins, B.G., Kowall, N.W., and Dedeoglu, A. (2010). Moderate exercise delays the motor performance decline in a transgenic model of ALS. Brain Res. *1313*, 192–201.

Carro, E., Trejo, J.L., Busiguina, S., and Torres-Aleman, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. J. Neurosci. *21*, 5678–5684.

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. BDNF ALS Study Group (Phase III). J. Neurol. Sci. *169*, 13–21.

Cheah, B.C., and Kiernan, M.C. (2010). Dexpramipexole, the R(+) enantiomer of pramipexole, for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis. IDrugs *13*, 911–920.

Cheah, B.C., Boland, R.A., Brodaty, N.E., Zoing, M.C., Jeffery, S.E., McKenzie, D.K., and Kiernan, M.C. (2009). INSPIRATIonAL--INSPIRAtory muscle training in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler *10*, 384–392.

Chen, A., Montes, J., and Mitsumoto, H. (2008). The role of exercise in amyotrophic lateral sclerosis. Phys Med Rehabil Clin N Am *19*, 545–557, ix–x.

Chen, H., Qian, K., Chen, W., Hu, B., Blackbourn, L.W., Du, Z., Ma, L., Liu, H., Knobel, K.M., Ayala, M., et al. (2015). Human-derived neural progenitors functionally replace astrocytes in adult mice. J. Clin. Invest. *125*, 1033–1042.

Chen, S., Wasserman, D.H., MacKintosh, C., and Sakamoto, K. (2011). Mice with AS160/TBC1D4-Thr649Ala knockin mutation are glucose intolerant with reduced insulin sensitivity and altered GLUT4 trafficking. Cell Metab. *13*, 68–79.

Chen, Z.-L., Yu, W.-M., and Strickland, S. (2007). Peripheral regeneration. Annu. Rev. Neurosci. 30, 209–233.

Chen, Z.-P., Stephens, T.J., Murthy, S., Canny, B.J., Hargreaves, M., Witters, L.A., Kemp, B.E., and McConell, G.K. (2003). Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. Diabetes *52*, 2205–2212.

Cheung, P.C., Salt, I.P., Davies, S.P., Hardie, D.G., and Carling, D. (2000). Characterization of AMPactivated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. Biochem. J. *346 Pt 3*, 659–669.

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.

Chin, C.-N., Dallas-Yang, Q., Liu, F., Ho, T., Ellsworth, K., Fischer, P., Natasha, T., Ireland, C., Lu, P., Li, C., et al. (2009). Evidence that inhibition of insulin receptor signaling activity by PC-1/ENPP1 is dependent on its enzyme activity. Eur. J. Pharmacol. *606*, 17–24.

Chio, A., Calvo, A., Dossena, M., Ghiglione, P., Mutani, R., and Mora, G. (2009). ALS in Italian professional soccer players: the risk is still present and could be soccer-specific. Amyotroph Lateral Scler *10*, 205–209.

Chiò, A., Calvo, A., Ilardi, A., Cavallo, E., Moglia, C., Mutani, R., Palmo, A., Galletti, R., Marinou, K., Papetti, L., et al. (2009). Lower serum lipid levels are related to respiratory impairment in patients with ALS. Neurology *73*, 1681–1685.

Chiò, A., Borghero, G., Calvo, A., Capasso, M., Caponnetto, C., Corbo, M., Giannini, F., Logroscino, G., Mandrioli, J., Marcello, N., et al. (2010). Lithium carbonate in amyotrophic lateral sclerosis: lack of efficacy in a dose-finding trial. Neurology *75*, 619–625.

Chitnis, M.M., Yuen, J.S.P., Protheroe, A.S., Pollak, M., and Macaulay, V.M. (2008). The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. Clin. Cancer Res. *14*, 6364–6370.

Choi, J.-K., Küstermann, E., Dedeoglu, A., and Jenkins, B.G. (2009). Magnetic resonance spectroscopy of regional brain metabolite markers in FALS mice and the effects of dietary creatine supplementation. Eur. J. Neurosci. *30*, 2143–2150.

Clarkson, P.M. (1992). Exercise-induced muscle damage--animal and human models. Med Sci Sports Exerc 24, 510–511.

Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boillée, S., Rule, M., McMahon, A.P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R.J., et al. (2003). Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. Science *302*, 113–117.

Cleveland, D.W., and Liu, J. (2000). Oxidation versus aggregation - how do SOD1 mutants cause ALS? Nat. Med. *6*, 1320–1321.

Cong, L.N., Chen, H., Li, Y., Zhou, L., McGibbon, M.A., Taylor, S.I., and Quon, M.J. (1997). Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. Mol. Endocrinol. *11*, 1881–1890.

Corcia, P., Camu, W., Praline, J., Gordon, P.H., Vourch, P., and Andres, C. (2009). The importance of the SMN genes in the genetics of sporadic ALS. Amyotroph Lateral Scler *10*, 436–440.

Coughlan, K.S., Mitchem, M.R., Hogg, M.C., and Prehn, J.H.M. (2015). "Preconditioning" with latrepirdine, an adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase activator, delays amyotrophic lateral sclerosis progression in SOD1(G93A) mice. Neurobiol. Aging *36*, 1140–1150.

Cox, L.E., Ferraiuolo, L., Goodall, E.F., Heath, P.R., Higginbottom, A., Mortiboys, H., Hollinger, H.C., Hartley, J.A., Brockington, A., Burness, C.E., et al. (2010). Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). PLoS ONE *5*, e9872.

Crippa, V., Boncoraglio, A., Galbiati, M., Aggarwal, T., Rusmini, P., Giorgetti, E., Cristofani, R., Carra, S., Pennuto, M., and Poletti, A. (2013). Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. Front Cell Neurosci *7*, 234.

Da Cruz, S., Parone, P.A., Lopes, V.S., Lillo, C., McAlonis-Downes, M., Lee, S.K., Vetto, A.P., Petrosyan, S., Marsala, M., Murphy, A.N., et al. (2012). Elevated PGC-1 $\alpha$  activity sustains mitochondrial biogenesis and muscle function without extending survival in a mouse model of inherited ALS. Cell Metab. *15*, 778–786.





Cudkowicz, M.E., Van den Berg, L.H., Shefner, J.M., Mitsumoto, H., Mora, J.S., Ludolph, A., Hardiman, O., Bozik, M.E., Ingersoll, E.W., Archibald, D., et al. (2013). Dexpramipexole versus placebo for patients with amyotrophic lateral sclerosis (EMPOWER): a randomised, double-blind, phase 3 trial. Lancet Neurol *12*, 1059–1067.

Cuervo, A.M., and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. Cell Res. *24*, 92–104.

Cuervo, A.M., Knecht, E., Terlecky, S.R., and Dice, J.F. (1995). Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. Am. J. Physiol. *269*, C1200–1208.

Dagon, Y., Mantzoros, C., and Kim, Y.-B. (2015). Exercising insulin sensitivity: AMPK turns on autophagy! Metab. Clin. Exp. 64, 655–657.

Dalakas, M.C., Hatazawa, J., Brooks, R.A., and Di Chiro, G. (1987). Lowered cerebral glucose utilization in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *22*, 580–586.

Van Damme, P., Van Den Bosch, L., Van Houtte, E., Callewaert, G., and Robberecht, W. (2002). GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity. J. Neurophysiol. *88*, 1279–1287.

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.

Davies, C.T., and White, M.J. (1982). Muscle weakness following dynamic exercise in humans. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol *53*, 236–241.

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. Lancet Neurol *7*, 409–416.

Deforges, S., Branchu, J., Biondi, O., Grondard, C., Pariset, C., Lécolle, S., Lopes, P., Vidal, P.P., Chanoine, C., and Charbonnier, F. (2009). Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. The Journal of Physiology *587*, 3561–3572.

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.

Delisle, M.B., and Carpenter, S. (1984). Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. Sci. 63, 241–250.

Van Den Bosch, L., and Robberecht, W. (2000). Different receptors mediate motor neuron death induced by short and long exposures to excitotoxicity. Brain Res. Bull. *53*, 383–388.

Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., and Roos, R.P. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. Science *261*, 1047–1051.

Desport, J.C., Preux, P.M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J.M., Beaufrère, B., and Couratier, P. (2001). Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Am. J. Clin. Nutr. *74*, 328–334.

Dodge, J.C., Treleaven, C.M., Fidler, J.A., Tamsett, T.J., Bao, C., Searles, M., Taksir, T.V., Misra, K., Sidman, R.L., Cheng, S.H., et al. (2013). Metabolic signatures of amyotrophic lateral sclerosis reveal insights into disease pathogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *110*, 10812–10817.





Dohm, G.L., Dolan, P.L., Frisell, W.R., and Dudek, R.W. (1993). Role of transverse tubules in insulin stimulated muscle glucose transport. J. Cell. Biochem. *52*, 1–7.

Donaghy, C., Clarke, J., Patterson, C., Kee, F., Hardiman, O., and Patterson, V. (2010). The epidemiology of motor neuron disease in Northern Ireland using capture-recapture methodology. Amyotroph Lateral Scler *11*, 374–378.

Donnelly, C.J., Zhang, P.-W., Pham, J.T., Haeusler, A.R., Heusler, A.R., Mistry, N.A., Vidensky, S., Daley, E.L., Poth, E.M., Hoover, B., et al. (2013). RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. Neuron *80*, 415–428.

Dorst, J., Kühnlein, P., Hendrich, C., Kassubek, J., Sperfeld, A.D., and Ludolph, A.C. (2011). Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. *258*, 613–617.

Douen, A.G., Ramlal, T., Klip, A., Young, D.A., Cartee, G.D., and Holloszy, J.O. (1989). Exerciseinduced increase in glucose transporters in plasma membranes of rat skeletal muscle. Endocrinology *124*, 449–454.

Drory, V.E., Goltsman, E., Reznik, J.G., Mosek, A., and Korczyn, A.D. (2001). The value of muscle exercise in patients with amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. Sci. *191*, 133–137.

Dubowitz, V. (2009). Ramblings in the history of spinal muscular atrophy. Neuromuscul. Disord. *19*, 69–73.

Dudley, G.A. (1988). Metabolic consequences of resistive-type exercise. Med Sci Sports Exerc 20, S158–161.

Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., and Sul, H.S. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. Annu. Rev. Nutr. 27, 79–101.

Dupuis, L., Oudart, H., René, 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., 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., Pradat, P.F., Ludolph, A.C., and Loeffler, J.P. (2011). Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. The Lancet Neurology *10*, 75–82.

De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. Annu. Rev. Physiol. 28, 435–492.

Egan, B., Carson, B.P., Garcia-Roves, P.M., Chibalin, A.V., Sarsfield, F.M., Barron, N., McCaffrey, N., Moyna, N.M., Zierath, J.R., and O'Gorman, D.J. (2010). Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. J. Physiol. (Lond.) *588*, 1779–1790.

Ekestern, E. (2004). Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. Neurodegener Dis *1*, 88–100.

Engesser-Cesar, C., Anderson, A.J., Basso, D.M., Edgerton, V.R., and Cotman, C.W. (2005). Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury. J. Neurotrauma *22*, 157–171.

Eschbach, J., Schwalenstöcker, B., Soyal, S.M., Bayer, H., Wiesner, D., Akimoto, C., Nilsson, A.-C., Birve, A., Meyer, T., Dupuis, L., et al. (2013). PGC-1α is a male-specific disease modifier of human and experimental amyotrophic lateral sclerosis. Hum. Mol. Genet. *22*, 3477–3484.





Essig, D.A., Alderson, N.L., Ferguson, M.A., Bartoli, W.P., and Durstine, J.L. (2000). Delayed effects of exercise on the plasma leptin concentration. Metab. Clin. Exp. *49*, 395–399.

Estévez, A.G., Crow, J.P., Sampson, J.B., Reiter, C., Zhuang, Y., Richardson, G.J., Tarpey, M.M., Barbeito, L., and Beckman, J.S. (1999). Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. Science *286*, 2498–2500.

Farg, M.A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J.M., Yang, S., Atkinson, R.A.K., Levina, V., Halloran, M.A., Gleeson, P.A., Blair, I.P., Soo, K.Y., et al. (2014). C9ORF72, implicated in amytrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. Hum. Mol. Genet. *23*, 3579–3595.

Fergani, A., Oudart, H., Gonzalez De Aguilar, J.-L., Fricker, B., René, F., Hocquette, J.-F., Meininger, V., Dupuis, L., and Loeffler, J.-P. (2007). Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. J. Lipid Res. *48*, 1571–1580.

Ferguson, C.J., Lenk, G.M., and Meisler, M.H. (2009). Defective autophagy in neurons and astrocytes from mice deficient in PI(3,5)P2. Hum. Mol. Genet. *18*, 4868–4878.

Ferraiuolo, L., De Bono, J.P., Heath, P.R., Holden, H., Kasher, P., Channon, K.M., Kirby, J., and Shaw, P.J. (2009). Transcriptional response of the neuromuscular system to exercise training and potential implications for ALS. J. Neurochem. *109*, 1714–1724.

Ferrarese, C., Sala, G., Riva, R., Begni, B., Zoia, C., Tremolizzo, L., Galimberti, G., Millul, A., Bastone, A., Mennini, T., et al. (2001). Decreased platelet glutamate uptake in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *56*, 270–272.

Ferrer-Alcon, M., Winkler-Hirt, C., Madani, R., Perrin, F.E., and Kato, A.C. (2008). Low intensity exercise attenuates disease progression and stimulates cell proliferation in the spinal cord of a mouse model with progressive motor neuronopathy. Neuroscience *152*, 291–295.

Figlewicz, D.A., Krizus, A., Martinoli, M.G., Meininger, V., Dib, M., Rouleau, G.A., and Julien, J.P. (1994a). Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. Hum. Mol. Genet. *3*, 1757–1761.

Figlewicz, D.A., Garruto, R.M., Krizus, A., Yanagihara, R., and Rouleau, G.A. (1994b). The Cu/Zn superoxide dismutase gene in ALS and parkinsonism-dementia of Guam. Neuroreport *5*, 557–560.

Finkelstein, A., Kunis, G., Seksenyan, A., Ronen, A., Berkutzki, T., Azoulay, D., Koronyo-Hamaoui, M., and Schwartz, M. (2011). Abnormal changes in NKT cells, the IGF-1 axis, and liver pathology in an animal model of ALS. PLoS ONE *6*, e22374.

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. Exp. Neurol. *185*, 232–240.

Fischer, U., Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1997). The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. Cell *90*, 1023–1029.

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., Parratt, J., and Swingler, R.J. (2007). The incidence of motor nueron disease in Scotland. J. Neurol. *254*, 866–869.

Fornai, F., Longone, P., Cafaro, L., Kastsiuchenka, O., Ferrucci, M., Manca, M.L., Lazzeri, G., Spalloni, A., Bellio, N., Lenzi, P., et al. (2008). Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *105*, 2052–2057.

Foufelle, F., and Ferré, P. (2007). [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. Med Sci (Paris) 23, 291–296.





Frampton, J.E. (2014). Pramipexole extended-release: a review of its use in patients with Parkinson's disease. Drugs 74, 2175–2190.

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.

Fuller, P.I., Reddrop, C., Rodger, J., Bellingham, M.C., and Phillips, J.K. (2006). Differential expression of the NMDA NR2B receptor subunit in motoneuron populations susceptible and resistant to amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci. Lett. *399*, 157–161.

Ganzini, L., Johnston, W.S., and Hoffman, W.F. (1999). Correlates of suffering in amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *52*, 1434–1440.

Gao, J., Ren, J., Gulve, E.A., and Holloszy, J.O. (1994). Additive effect of contractions and insulin on GLUT-4 translocation into the sarcolemma. J. Appl. Physiol. 77, 1597–1601.

Gijselinck, I., Van Langenhove, T., Van der Zee, J., Sleegers, K., Philtjens, S., Kleinberger, G., Janssens, J., Bettens, K., Van Cauwenberghe, C., Pereson, S., et al. (2012). A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. Lancet Neurol *11*, 54–65.

Gil, J., Funalot, B., Torny, F., Lacoste, M., and Couratier, P. (2007). [Exogenous risk factors in sporadic ALS: a review of the literature]. Rev. Neurol. (Paris) *163*, 1021–1030.

Gomez-Cabrera, M.-C., Viña, J., and Ji, L.L. (2009). Interplay of oxidants and antioxidants during exercise: implications for muscle health. Phys Sportsmed *37*, 116–123.

Gomez-Merino, D., Chennaoui, M., Drogou, C., Bonneau, D., and Guezennec, C.Y. (2002). Decrease in serum leptin after prolonged physical activity in men. Med Sci Sports Exerc *34*, 1594–1599.

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.

Goodwin, V.A., Richards, S.H., Taylor, R.S., Taylor, A.H., and Campbell, J.L. (2008). The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. Mov. Disord. *23*, 631–640.

Gordon, P.H. (2013). Amyotrophic Lateral Sclerosis: An update for 2013 Clinical Features, Pathophysiology, Management and Therapeutic Trials. Aging Dis *4*, 295–310.

Gordon, T., Tyreman, N., Li, S., Putman, C.T., and Hegedus, J. (2010). Functional over-load saves motor units in the SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol. Dis. *37*, 412–422.

Gotkine, M., Friedlander, Y., and Hochner, H. (2014). Triathletes are over-represented in a population of patients with ALS. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener *15*, 534–536.

Gowans, G.J., and Hardie, D.G. (2014). AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP. Biochem. Soc. Trans. *4*2, 71–75.

Greer, E.L., Oskoui, P.R., Banko, M.R., Maniar, J.M., Gygi, M.P., Gygi, S.P., and Brunet, A. (2007). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. J. Biol. Chem. *282*, 30107–30119.

Gribkoff, V.K., and Bozik, M.E. (2008). KNS-760704 [(6R)-4,5,6,7-tetrahydro-N6-propyl-2, 6-benzothiazole-diamine dihydrochloride monohydrate] for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. CNS Neurosci Ther *14*, 215–226.





Grondard, C., Biondi, O., Armand, A.S., Lécolle, S., Della Gaspera, B., Pariset, C., Li, H., Gallien, C.L., Vidal, P.P., and Chanoine, C. (2005). Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. The Journal of Neuroscience *25*, 7615–7622.

Grondard, C., Biondi, O., Pariset, C., Lopes, P., Deforges, S., Lécolle, S., Gaspera, B.D., Gallien, C.-L., Chanoine, C., and Charbonnier, F. (2008). Exercise-induced modulation of calcineurin activity parallels the time course of myofibre transitions. J. Cell. Physiol. *214*, 126–135.

Gros-Louis, F., Gaspar, C., and Rouleau, G.A. (2006). Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Biochim. Biophys. Acta *1762*, 956–972.

Grunseich, C., Rinaldi, C., and Fischbeck, K.H. (2014). Spinal and bulbar muscular atrophy: pathogenesis and clinical management. Oral Dis *20*, 6–9.

Guégan, C., Vila, M., Rosoklija, G., Hays, A.P., and Przedborski, S. (2001). Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurosci. *21*, 6569–6576.

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., and Deng, H.X. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science *264*, 1772–1775.

Hajduch, E., Alessi, D.R., Hemmings, B.A., and Hundal, H.S. (1998). Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. Diabetes *47*, 1006–1013.

Hall, E.D., Andrus, P.K., Oostveen, J.A., Fleck, T.J., and Gurney, M.E. (1998). Relationship of oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. J. Neurosci. Res. *53*, 66–77.

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? J. Neurochem. *97*, 1634–1658.

Ham, J., Eilers, A., Whitfield, J., Neame, S.J., and Shah, B. (2000). c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. Biochem. Pharmacol. *60*, 1015–1021.

Hamer, M., and Chida, Y. (2009). Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. Psychol Med *39*, 3–11.

Hand, C.K., and Rouleau, G.A. (2002). Familial amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 25, 135–159.

Harada, M., Hanada, S., Toivola, D.M., Ghori, N., and Omary, M.B. (2008). Autophagy activation by rapamycin eliminates mouse Mallory-Denk bodies and blocks their proteasome inhibitor-mediated formation. Hepatology *47*, 2026–2035.

Hardie, D.G. (2007). Biochemistry. Balancing cellular energy. Science 315, 1671–1672.

Hardie, D.G., and Pan, D.A. (2002). Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. Biochem. Soc. Trans. *30*, 1064–1070.

Harwood, C.A., McDermott, C.J., and Shaw, P.J. (2009). Physical activity as an exogenous risk factor in motor neuron disease (MND): a review of the evidence. Amyotrophic Lateral Sclerosis *10*, 191–204.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. 18, 1926-1945.

Hayward, C., Colville, S., Swingler, R.J., and Brock, D.J. (1999). Molecular genetic analysis of the APEX nuclease gene in amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *52*, 1899–1901.





He, C., Sumpter, R., and Levine, B. (2012). Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. Autophagy *8*, 1548–1551.

Hegedus, J., Putman, C.T., and Gordon, T. (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol. Dis. *28*, 154–164.

Henkel, J.S., Beers, D.R., Zhao, W., and Appel, S.H. (2009). Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. J Neuroimmune Pharmacol *4*, 389–398.

Henneman, E. (1991). The size principle and its relation to transmission failure in la projections to spinal motoneurons. Ann. N. Y. Acad. Sci. *627*, 165–168.

Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., and Bolaños, J.P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. Nat. Cell Biol. *11*, 747–752.

Hideyama, T., Yamashita, T., Nishimoto, Y., Suzuki, T., and Kwak, S. (2010). Novel etiological and therapeutic strategies for neurodiseases: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J. Pharmacol. Sci. *113*, 9–13.

Higgins, C.M.J., 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.

Hillel, A.D., Miller, R.M., Yorkston, K., McDonald, E., Norris, F.H., and Konikow, N. (1989). Amyotrophic lateral sclerosis severity scale. Neuroepidemiology *8*, 142–150.

Hirshman, M.F., Wallberg-Henriksson, H., Wardzala, L.J., Horton, E.D., and Horton, E.S. (1988). Acute exercise increases the number of plasma membrane glucose transporters in rat skeletal muscle. FEBS Lett. *238*, 235–239.

Hirtz, D., Thurman, D.J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A.R., and Zalutsky, R. (2007). How common are the "common" neurologic disorders? Neurology *68*, 326–337.

Holl, N., Echaniz-Laguna, A., Bierry, G., Mohr, M., Loeffler, J.-P., Moser, T., Dietemann, J.-L., and Kremer, S. (2008). Diffusion-weighted MRI of denervated muscle: a clinical and experimental study. Skeletal Radiol. *37*, 1111–1117.

Holloszy, J.O., Constable, S.H., and Young, D.A. (1986). Activation of glucose transport in muscle by exercise. Diabetes Metab Rev *1*, 409–423.

Holman, G.D., Kozka, I.J., Clark, A.E., Flower, C.J., Saltis, J., Habberfield, A.D., Simpson, I.A., and Cushman, S.W. (1990). Cell surface labeling of glucose transporter isoform GLUT4 by bis-mannose photolabel. Correlation with stimulation of glucose transport in rat adipose cells by insulin and phorbol ester. J. Biol. Chem. *265*, 18172–18179.

Hoppeler, H., and Fluck, M. (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. Med Sci Sports Exerc *35*, 95–104.

Huang, S., and Houghton, P.J. (2001). Mechanisms of resistance to rapamycins. Drug Resist. Updat. *4*, 378–391.

Ince, P.G., Shaw, P.J., Slade, J.Y., Jones, C., and Hudgson, P. (1996). Familial amyotrophic lateral sclerosis with a mutation in exon 4 of the Cu/Zn superoxide dismutase gene: pathological and immunocytochemical changes. Acta Neuropathol. *92*, 395–403.

Ito, Y., Yamada, M., Tanaka, H., Aida, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H., and Hara, H. (2009). Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. Neurobiol. Dis. *36*, 470–476.





Itoh, H., Ohkuwa, T., Yamamoto, T., Sato, Y., Miyamura, M., and Naoi, M. (1998). Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. Life Sci. *63*, 1921–1929.

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.

Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. Traffic *9*, 574–587.

Jain, A., Rusten, T.E., Katheder, N., Elvenes, J., Bruun, J.-A., Sjøttem, E., Lamark, T., and Johansen, T. (2015). p62/Sequestosome-1, Autophagy-related Gene 8, and Autophagy in Drosophila Are Regulated by Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (NRF2), Independent of Transcription Factor TFEB. J. Biol. Chem. *290*, 14945–14962.

Jamart, C., Naslain, D., Gilson, H., and Francaux, M. (2013). Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *305*, E964–974.

Jawaid, A., Murthy, S.B., Wilson, A.M., Qureshi, S.U., Amro, M.J., Wheaton, M., Simpson, E., Harati, Y., Strutt, A.M., York, M.K., et al. (2010). A decrease in body mass index is associated with faster progression of motor symptoms and shorter survival in ALS. Amyotroph Lateral Scler *11*, 542–548.

Jette, D.U. (1984). Physiological effects of exercise in the diabetic. Phys Ther 64, 339–342.

Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 11946–11950.

Johnson, W.G. (2000). Late-onset neurodegenerative diseases--the role of protein insolubility. J. Anat. *196 (Pt 4)*, 609–616.

Johnston, C.A., Stanton, B.R., Turner, M.R., Gray, R., Blunt, A.H.-M., 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.

Jones, D.A., Newham, D.J., Round, J.M., and Tolfree, S.E. (1986). Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. J. Physiol. (Lond.) *375*, 435–448.

Jung, C., Higgins, C.M.J., and Xu, Z. (2002). A quantitative histochemical assay for activities of mitochondrial electron transport chain complexes in mouse spinal cord sections. J. Neurosci. Methods *114*, 165–172.

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.

Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell Metab. *1*, 15–25.

Kamel, F., Umbach, D.M., Munsat, T.L., Shefner, J.M., and Sandler, D.P. (1999). Association of cigarette smoking with amyotrophic lateral sclerosis. Neuroepidemiology *18*, 194–202.

Kanai, K., Kuwabara, S., Misawa, S., Tamura, N., Ogawara, K., Nakata, M., Sawai, S., Hattori, T., and Bostock, H. (2006). Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. Brain *129*, 953–962.





Kaneb, H.M., Sharp, P.S., Rahmani-Kondori, N., and Wells, D.J. (2011). Metformin treatment has no beneficial effect in a dose-response survival study in the SOD1(G93A) mouse model of ALS and is harmful in female mice. PLoS ONE *6*, e24189.

Karamouzis, I., Karamouzis, M., Vrabas, I.S., Christoulas, K., Kyriazis, N., Giannoulis, E., and Mandroukas, K. (2002). The effects of marathon swimming on serum leptin and plasma neuropeptide Y levels. Clin. Chem. Lab. Med. *40*, 132–136.

Kaspar, B.K., Frost, L.M., Christian, L., Umapathi, P., and Gage, F.H. (2005). Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *57*, 649–655.

Kato, S., Shimoda, M., Watanabe, Y., Nakashima, K., Takahashi, K., and Ohama, E. (1996). Familial amyotrophic lateral sclerosis with a two base pair deletion in superoxide dismutase 1: gene multisystem degeneration with intracytoplasmic hyaline inclusions in astrocytes. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *55*, 1089–1101.

Kavanagh, T. (1983). Exercise and the heart. Ann. Acad. Med. Singap. 12, 331–337.

Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2002). Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive elementbinding protein by AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. *277*, 3829–3835.

Kerman, A., Liu, H.-N., Croul, S., Bilbao, J., Rogaeva, E., Zinman, L., Robertson, J., and Chakrabartty, A. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis is a non-amyloid disease in which extensive misfolding of SOD1 is unique to the familial form. Acta Neuropathol. *119*, 335–344.

Khoris, J., Moulard, B., Briolotti, V., Hayer, M., Durieux, A., Clavelou, P., Malafosse, A., Rouleau, G.A., and Camu, W. (2000). Coexistence of dominant and recessive familial amyotrophic lateral sclerosis with the D90A Cu,Zn superoxide dismutase mutation within the same country. Eur. J. Neurol. *7*, 207–211.

Kieran, D., Woods, I., Villunger, A., Strasser, A., and Prehn, J.H.M. (2007). Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 20606–20611.

Kiernan, M.C. (2009). Hyperexcitability, persistent Na+ conductances and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. Exp. Neurol. *218*, 1–4.

Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., and Cuervo, A.M. (2004). Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. Mol. Biol. Cell *15*, 4829–4840.

Kikuchi, H., Almer, G., Yamashita, S., Guégan, C., Nagai, M., Xu, Z., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., 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, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat. Cell Biol. *13*, 132–141.

Kirkinezos, I.G., Hernandez, D., Bradley, W.G., and Moraes, C.T. (2003). Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *53*, 804–807.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et al. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. Dev. Cell *5*, 539–545.

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy *8*, 445–544.





Klip, A., Ramlal, T., Young, D.A., and Holloszy, J.O. (1987). Insulin-induced translocation of glucose transporters in rat hindlimb muscles. FEBS Lett. 224, 224–230.

Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Roth, R.A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. J. Biol. Chem. *271*, 31372–31378.

Koshinaka, K., Kawasaki, E., Hokari, F., and Kawanaka, K. (2009). Effect of acute high-intensity intermittent swimming on post-exercise insulin responsiveness in epitrochlearis muscle of fed rats. Metab. Clin. Exp. *58*, 246–253.

Kraft, A.D., Resch, J.M., Johnson, D.A., and Johnson, J.A. (2007). Activation of the Nrf2-ARE pathway in muscle and spinal cord during ALS-like pathology in mice expressing mutant SOD1. Exp. Neurol. *207*, 107–117.

Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. Mol. Cell *40*, 280–293.

Kruk, J. (2009). Physical activity and health. Asian Pac. J. Cancer Prev. 10, 721–728.

Kuipers, H. (1994). Exercise-induced muscle damage. Int J Sports Med 15, 132–135.

Kunst, C.B., Messer, L., Gordon, J., Haines, J., and Patterson, D. (2000). Genetic mapping of a mouse modifier gene that can prevent ALS onset. Genomics *70*, 181–189.

Kuo, J.J., Siddique, T., Fu, R., and Heckman, C.J. (2005). Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurones cultured from mutant SOD1 mice. J. Physiol. (Lond.) *563*, 843–854.

Kurtzke, J.F. (1982). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. Adv Neurol 36, 281–302.

Kushner, P.D., Stephenson, D.T., and Wright, S. (1991). Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *50*, 263–277.

Kwiatkowski, T.J., 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.

Lacomblez, L., Doppler, V., Beucler, I., Costes, G., Salachas, F., Raisonnier, A., Le Forestier, N., Pradat, P.-F., Bruckert, E., and Meininger, V. (2002). APOE: a potential marker of disease progression in ALS. Neurology *58*, 1112–1114.

Laferriere, F., and Polymenidou, M. (2015). Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Swiss Med Wkly *145*, w14054.

Lagier-Tourenne, C., Baughn, M., Rigo, F., Sun, S., Liu, P., Li, H.-R., Jiang, J., Watt, A.T., Chun, S., Katz, M., et al. (2013). Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *110*, E4530–4539.

Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., Desmet, F., Marklund, S.L., Wyns, S., Thijs, V., Andersson, J., Van Marion, I., et al. (2003). VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. Nat. Genet. *34*, 383–394.

Laron, Z. (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. MP, Mol. Pathol. 54, 311-316.

Larsen, K.B., Lamark, T., Øvervatn, A., Harneshaug, I., Johansen, T., and Bjørkøy, G. (2010). A reporter cell system to monitor autophagy based on p62/SQSTM1. Autophagy *6*, 784–793.





Leclerc, N., Ribera, F., Zoll, J., Warter, J.M., Poindron, P., Lampert, E., and Borg, J. (2001). Selective changes in mitochondria respiratory properties in oxidative or glycolytic muscle fibers isolated from G93AhumanSOD1 transgenic mice. Neuromuscul. Disord. *11*, 722–727.

Lee, J.K., Shin, J.H., Lee, J.E., and Choi, E.-J. (2015). Role of autophagy in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. Biochim. Biophys. Acta *185*2, 2517–2524.

Lehéricey, G., Le Forestier, N., Dupuis, L., Gonzalez-Bermejo, J., Meininger, V., and Pradat, P.-F. (2012). [Nutritional management in amyotrophic lateral sclerosis: A medical and ethical stake]. Presse Med *41*, 560–574.

Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., et al. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. J. Biol. Chem. *272*, 3137–3140.

Leigh, P.N., Whitwell, H., Garofalo, O., Buller, J., Swash, M., Martin, J.E., Gallo, J.M., Weller, R.O., and Anderton, B.H. (1991). Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. Brain *114 (Pt 2)*, 775–788.

Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 132, 27–42.

Li, L., Zhang, X., and Le, W. (2008). Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. Autophagy *4*, 290–293.

Li, T.M., Alberman, E., and Swash, M. (1990). Clinical features and associations of 560 cases of motor neuron disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. *53*, 1043–1045.

Liang, H., Ward, W.F., Jang, Y.C., Bhattacharya, A., Bokov, A.F., Li, Y., Jernigan, A., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2011). PGC-1α protects neurons and alters disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. Muscle Nerve *44*, 947–956.

Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., et al. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature *418*, 797–801.

Lindauer, E., Dupuis, L., Müller, H.-P., Neumann, H., Ludolph, A.C., and Kassubek, J. (2013). Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. PLoS ONE *8*, e67783.

Lino, M.M., Schneider, C., and Caroni, P. (2002). Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. The Journal of Neuroscience *22*, 4825–4832.

Lisle, S., and Tennison, M. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis: the role of exercise. Curr Sports Med Rep *14*, 45–46.

Liu, Y.-J., Lee, L.-M., Lai, H.-L., and Chern, Y. (2015a). Aberrant activation of AMP-activated protein kinase contributes to the abnormal distribution of HuR in amyotrophic lateral sclerosis. FEBS Lett. *589*, 432–439.

Liu, Y.-J., Ju, T.-C., Chen, H.-M., Jang, Y.-S., Lee, L.-M., Lai, H.-L., Tai, H.-C., Fang, J.-M., Lin, Y.-L., Tu, P.-H., et al. (2015b). Activation of AMP-activated protein kinase α1 mediates mislocalization of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. Hum. Mol. Genet. *24*, 787–801.

Llorens-Martín, M., Torres-Alemán, I., and Trejo, J.L. (2010). Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. Mol. Cell. Neurosci. *44*, 109–117.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 4465–4470.




Logroscino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chiò, A., Mitchell, D., Swingler, R.J., Millul, A., Benn, E., Beghi, E., and EURALS (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. *81*, 385–390.

Longstreth, W.T., Nelson, L.M., Koepsell, T.D., and Van Belle, G. (1991). Hypotheses to explain the association between vigorous physical activity and amyotrophic lateral sclerosis. Med. Hypotheses *34*, 144–148.

Van Loon, L.J., Greenhaff, P.L., Constantin-Teodosiu, D., Saris, W.H., and Wagenmakers, A.J. (2001). The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. J. Physiol. (Lond.) *536*, 295–304.

Macchi, Z., Wang, Y., Moore, D., Katz, J., Saperstein, D., Walk, D., Simpson, E., Genge, A., Bertorini, T., Fernandes, J.A., et al. (2015). A multi-center screening trial of rasagiline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Possible mitochondrial biomarker target engagement. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 1–8.

Mackenzie, I.R.A., Bigio, E.H., Ince, P.G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N.J., Kwong, L.K., Forman, M.S., Ravits, J., Stewart, H., et al. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. Ann. Neurol. *61*, 427–434.

Mackenzie, I.R.A., Munoz, D.G., Kusaka, H., Yokota, O., Ishihara, K., Roeber, S., Kretzschmar, H.A., Cairns, N.J., and Neumann, M. (2011). Distinct pathological subtypes of FTLD-FUS. Acta Neuropathol. *121*, 207–218.

Magistretti, P.J. (2009). Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. Am. J. Clin. Nutr. 90, 875S-880S.

Mahlapuu, M., Johansson, C., Lindgren, K., Hjälm, G., Barnes, B.R., Krook, A., Zierath, J.R., Andersson, L., and Marklund, S. (2004). Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *286*, E194–200.

Mahoney, D.J., Rodriguez, C., Devries, M., Yasuda, N., and Tarnopolsky, M.A. (2004). Effects of highintensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve *29*, 656–662.

Malaspina, A., Ngoh, S.F.A., Ward, R.E., Hall, J.C.E., Tai, F.W.D., Yip, P.K., Jones, C., Jokic, N., Averill, S.A., Michael-Titus, A.T., et al. (2010). Activation transcription factor-3 activation and the development of spinal cord degeneration in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience *169*, 812–827.

Mancuso, R., Del Valle, J., Modol, L., Martinez, A., Granado-Serrano, A.B., Ramirez-Núñez, O., Pallás, M., Portero-Otin, M., Osta, R., and Navarro, X. (2014). Resveratrol improves motoneuron function and extends survival in SOD1(G93A) ALS mice. Neurotherapeutics *11*, 419–432.

Marette, A., Richardson, J.M., Ramlal, T., Balon, T.W., Vranic, M., Pessin, J.E., and Klip, A. (1992). Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. Am. J. Physiol. *263*, C443–452.

Martin, L.J., and Chang, Q. (2012). Inhibitory synaptic regulation of motoneurons: a new target of disease mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. Mol. Neurobiol. *45*, 30–42.

Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S., and Sandri, M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. Cell Metab. *10*, 507–515.





Mattiazzi, 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.

McCrate, M.E., and Kaspar, B.K. (2008). Physical activity and neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis. Neuromolecular Med. *10*, 108–117.

McFarlan, J.T., Yoshida, Y., Jain, S.S., Han, X.-X., Snook, L.A., Lally, J., Smith, B.K., Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P., Sayer, R.A., et al. (2012). In vivo, fatty acid translocase (CD36) critically regulates skeletal muscle fuel selection, exercise performance, and training-induced adaptation of fatty acid oxidation. J. Biol. Chem. *287*, 23502–23516.

McKenzie, M.J., and Goldfarb, A.H. (2007). Aerobic exercise bout effects on gene transcription in the rat soleus. Med Sci Sports Exerc 39, 1515–1521.

Meininger, V., Pradat, P.-F., Corse, A., Al-Sarraj, S., Rix Brooks, B., Caress, J.B., Cudkowicz, M., Kolb, S.J., Lange, D., Leigh, P.N., et al. (2014). Safety, pharmacokinetic, and functional effects of the nogo-a monoclonal antibody in amyotrophic lateral sclerosis: a randomized, first-in-human clinical trial. PLoS ONE *9*, e97803.

Meyer, T., Schwan, A., Dullinger, J.S., Brocke, J., Hoffmann, K.-T., Nolte, C.H., Hopt, A., Kopp, U., Andersen, P., Epplen, J.T., et al. (2005). Early-onset ALS with long-term survival associated with spastin gene mutation. Neurology *65*, 141–143.

Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (1998). Mitochondria and apoptosis. Eur. J. Biochem. 252, 1–15.

Mikesky, A.E., Giddings, C.J., Matthews, W., and Gonyea, W.J. (1991). Changes in muscle fiber size and composition in response to heavy-resistance exercise. Med Sci Sports Exerc 23, 1042–1049.

Miledi, R., and Slater, C.R. (1968). Electrophysiology and electron-microscopy of rat neuromuscular junctions after nerve degeneration. Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. *169*, 289–306.

Miller, J.B. (1991). Myoblasts, myosins, MyoDs, and the diversification of muscle fibers. Neuromuscul. Disord. *1*, 7–17.

Miller, R.G., Moore, D.H., Forshew, D.A., Katz, J.S., Barohn, R.J., Valan, M., Bromberg, M.B., Goslin, K.L., Graves, M.C., McCluskey, L.F., et al. (2011). Phase II screening trial of lithium carbonate in amyotrophic lateral sclerosis: examining a more efficient trial design. Neurology *77*, 973–979.

Miller, T.M., Pestronk, A., David, W., Rothstein, J., Simpson, E., Appel, S.H., Andres, P.L., Mahoney, K., Allred, P., Alexander, K., et al. (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. Lancet Neurol *12*, 435–442.

Misra, A., and Garg, A. (1996). Leptin, its receptor and obesity. J. Investig. Med. 44, 540–548.

Mitchell, J.D., and Borasio, G.D. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 369, 2031–2041.

Miyazaki, K., Masamoto, K., Morimoto, N., Kurata, T., Mimoto, T., Obata, T., Kanno, I., and Abe, K. (2012). Early and progressive impairment of spinal blood flow-glucose metabolism coupling in motor neuron degeneration of ALS model mice. J. Cereb. Blood Flow Metab. *32*, 456–467.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. Mol. Biol. Cell *15*, 1101–1111.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27, 107–132.





Möller, J.C., and Oertel, W.H. (2000). Pramipexole in the treatment of advanced Parkinson's disease. Eur. J. Neurol. *7 Suppl 1*, 21–25.

Morimoto, N., Nagai, M., Ohta, Y., Miyazaki, K., Kurata, T., Morimoto, M., Murakami, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Kamiya, T., et al. (2007). Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. Brain Res. *1167*, 112–117.

Morrison, B.M., Lee, Y., and Rothstein, J.D. (2013). Oligodendroglia: metabolic supporters of axons. Trends Cell Biol. 23, 644–651.

Morton, J.P., Holloway, K., Woods, P., Cable, N.T., Burniston, J., Evans, L., Kayani, A.C., and McArdle, A. (2009). Exercise training-induced gender-specific heat shock protein adaptations in human skeletal muscle. Muscle Nerve *39*, 230–233.

Moruzzi, E.V., and Bergamini, E. (1983). Effect of denervation on glycogen metabolism in fast and slow muscle of rat. Muscle Nerve *6*, 356–366.

Moulard, B., Salachas, F., Chassande, B., Briolotti, V., Meininger, V., Malafosse, A., and Camu, W. (1998). Association between centromeric deletions of the SMN gene and sporadic adult-onset lower motor neuron disease. Ann. Neurol. *43*, 640–644.

Mounier, R., Théret, M., Lantier, L., Foretz, M., and Viollet, B. (2015). Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. Trends Endocrinol. Metab. *26*, 275–286.

Mourelatos, Z., Gonatas, N.K., Stieber, A., Gurney, M.E., and Dal Canto, M.C. (1996). The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *93*, 5472–5477.

Mu, X., He, J., Anderson, D.W., Trojanowski, J.Q., and Springer, J.E. (1996). Altered expression of bcl-2 and bax mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord motor neurons. Ann. Neurol. *40*, 379–386.

Mulder, D.W., Kurland, L.T., Offord, K.P., and Beard, C.M. (1986). Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *36*, 511–517.

Muller, F.L., Song, W., Jang, Y.C., Liu, Y., Sabia, M., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2007). Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *293*, R1159–1168.

Murai, A., Miyahara, T., Tanaka, T., Kaneko, T., Sako, Y., and Kameyama, M. (1983). Abnormalities of lipoprotein and carbohydrate metabolism in degenerative diseases of the nervous system--motor neuron disease and spinocerebellar degeneration. Tohoku J. Exp. Med. *139*, 365–376.

Murakami, T., Yang, S.-P., Xie, L., Kawano, T., Fu, D., Mukai, A., Bohm, C., Chen, F., Robertson, J., Suzuki, H., et al. (2012). ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in Caenorhabditis elegans by a dominant gain-of-function mechanism. Hum. Mol. Genet. *21*, 1–9.

Nagano, I., Shiote, M., Murakami, T., Kamada, H., Hamakawa, Y., Matsubara, E., Yokoyama, M., Moritaz, K., Shoji, M., and Abe, K. (2005). Beneficial effects of intrathecal IGF-1 administration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurol. Res. *27*, 768–772.

Nagano, Y., Tsubaki, T., and Chase, T.N. (1979). Endocrinologic regulation of carbohydrate metabolism. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia on Guam. Arch. Neurol. *36*, 217–220.

Nakagomi, S., Suzuki, Y., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., and Kiyama, H. (2003). Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. J. Neurosci. 23, 5187–5196.





Narai, H., Nagano, I., Ilieva, H., Shiote, M., Nagata, T., Hayashi, T., Shoji, M., and Abe, K. (2005). Prevention of spinal motor neuron death by insulin-like growth factor-1 associating with the signal transduction systems in SODG93A transgenic mice. J. Neurosci. Res. *82*, 452–457.

Narbonne, P., and Roy, R. (2009). [AMP-activated protein kinase (AMPK) allows prolonged energy stockpile!]. Med Sci (Paris) *25*, 565–566.

Nassif, M., Matus, S., Castillo, K., and Hetz, C. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a journey through the secretory pathway. Antioxid. Redox Signal. *13*, 1955–1989.

Nassif, M., Valenzuela, V., Rojas-Rivera, D., Vidal, R., Matus, S., Castillo, K., Fuentealba, Y., Kroemer, G., Levine, B., and Hetz, C. (2014). Pathogenic role of BECN1/Beclin 1 in the development of amyotrophic lateral sclerosis. Autophagy *10*, 1256–1271.

Nes, W.R. (1974). Role of sterols in membranes. Lipids 9, 596–612.

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.

Nonneman, A., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2014). The role of oligodendroglial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. Neurodegener Dis Manag *4*, 223–239.

O'Reilly, É.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.

Oeda, T., Shimohama, S., Kitagawa, N., Kohno, R., Imura, T., Shibasaki, H., and Ishii, N. (2001). Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic Caenorhabditis elegans. Hum. Mol. Genet. *10*, 2013–2023.

Ozdinler, P.H., and Macklis, J.D. (2006). IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. Nat. Neurosci. *9*, 1371–1381.

Pacy, P.J., Webster, J., and Garrow, J.S. (1986). Exercise and obesity. Sports Med 3, 89–113.

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.

Pang, T.Y.C., Stam, N.C., Nithianantharajah, J., Howard, M.L., and Hannan, A.J. (2006). Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. Neuroscience *141*, 569–584.

Pasinelli, P., Belford, M.E., Lennon, N., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., Trotti, D., and Brown, R.H. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. Neuron *43*, 19–30.

Patel, B.P., and Hamadeh, M.J. (2009). Nutritional and exercise-based interventions in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. Clin Nutr 28, 604–617.

De Paula, M.L., Cui, Q.-L., Hossain, S., Antel, J., and Almazan, G. (2014). The PTEN inhibitor bisperoxovanadium enhances myelination by amplifying IGF-1 signaling in rat and human oligodendrocyte progenitors. Glia *6*2, 64–77.

Perera, N.D., Sheean, R.K., Scott, J.W., Kemp, B.E., Horne, M.K., and Turner, B.J. (2014). Mutant TDP-43 deregulates AMPK activation by PP2A in ALS models. PLoS ONE *9*, e90449.





Perrie, W.T., Lee, G.T., Curtis, E.M., Sparke, J., Buller, J.R., and Rossi, M.L. (1993). Changes in the myelinated axons of femoral nerve in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neural Transm. Suppl. *39*, 223–233.

Pette, D., and Staron, R.S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Microsc. Res. Tech. *50*, 500–509.

Pettmann, B., Raoul, C., and Haase, G. (2006). [Death of the motor neurones in amyotrophic lateral sclerosis: suicide or murder?]. Med Sci (Paris) 22, 923–925.

Pimentel, G.D., Ropelle, E.R., Rocha, G.Z., and Carvalheira, J.B.C. (2013). The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. Metab. Clin. Exp. *62*, 171–178.

Pinto, A.C., Alves, M., Nogueira, A., Evangelista, T., Carvalho, J., Coelho, A., De Carvalho, M., and Sales-Luís, M.L. (1999). Can amyotrophic lateral sclerosis patients with respiratory insufficiency exercise? J. Neurol. Sci. *169*, 69–75.

Piquet, M.-A. (2006). [Nutritional approach for patients with amyotrophic lateral sclerosis]. Rev. Neurol. (Paris) *162 Spec No 2*, 4S177–174S187.

Pizzasegola, C., Caron, I., Daleno, C., Ronchi, A., Minoia, C., Carrì, M.T., and Bendotti, C. (2009). Treatment with lithium carbonate does not improve disease progression in two different strains of SOD1 mutant mice. Amyotroph Lateral Scler *10*, 221–228.

Plaitakis, A., and Constantakakis, E. (1993). Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res. Bull. *30*, 381–386.

Popov, K.M., Kedishvili, N.Y., Zhao, Y., Gudi, R., and Harris, R.A. (1994). Molecular cloning of the p45 subunit of pyruvate dehydrogenase kinase. J. Biol. Chem. *269*, 29720–29724.

Poulton, K.R., and Rossi, M.L. (1993). Peripheral nerve protein glycation and muscle fructolysis: evidence of abnormal carbohydrate metabolism in ALS. Funct. Neurol. *8*, 33–42.

Pradat, P.-F., Bruneteau, G., Gordon, P.H., Dupuis, L., Bonnefont-Rousselot, D., Simon, D., Salachas, F., Corcia, P., Frochot, V., Lacorte, J.-M., et al. (2010). Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler *11*, 166–171.

Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K., and Rouleau, G.A. (2001). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. J. Neurosci. *21*, 3369–3374.

Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr. Rev. *24*, 78–90.

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., Chiò, A., Calvo, A., Corbo, M., Lunetta, C., Marin, B., et al. (2014). Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: a European population-based case-control study. Ann. Neurol. *75*, 708–716.

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.





Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R.N., Gilpin, C., and Levine, B. (2007). Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. Cell *128*, 931–946.

Radak, Z., Gaal, D., Taylor, A.W., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., and Goto, S. (2002). Attenuation of the development of murine solid leukemia tumor by physical exercise. Antioxid. Redox Signal. *4*, 213–219.

Rakhit, R., Crow, J.P., Lepock, J.R., Kondejewski, L.H., Cashman, N.R., and Chakrabartty, A. (2004). Monomeric Cu,Zn-superoxide dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. J. Biol. Chem. *279*, 15499–15504.

Ramesh, T., Lyon, A.N., Pineda, R.H., Wang, C., Janssen, P.M.L., Canan, B.D., Burghes, A.H.M., and Beattie, C.E. (2010). A genetic model of amyotrophic lateral sclerosis in zebrafish displays phenotypic hallmarks of motoneuron disease. Dis Model Mech *3*, 652–662.

Raoul, C., Buhler, E., Sadeghi, C., Jacquier, A., Aebischer, P., Pettmann, B., Henderson, C.E., and Haase, G. (2006). Chronic activation in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice of a feedback loop involving Fas, Daxx, and FasL. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 6007–6012.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. Physiol. Rev. *90*, 1383–1435.

Razi, M., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2009). Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. J. Cell Biol. *185*, 305–321.

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., et al. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutasedeficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. Nat. Genet. *13*, 43–47.

Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, 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.

Reyes, E.T., Perurena, O.H., Festoff, B.W., Jorgensen, R., and Moore, W.V. (1984). Insulin resistance in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. Sci. *63*, 317–324.

Richter, E.A., and Ruderman, N.B. (2009). AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. Biochem. J. *418*, 261–275.

Riley, J., Federici, T., Polak, M., Kelly, C., Glass, J., Raore, B., Taub, J., Kesner, V., Feldman, E.L., and Boulis, N.M. (2012). Intraspinal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I safety trial, technical note, and lumbar safety outcomes. Neurosurgery *71*, 405–416; discussion 416.

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.

Ritland, S. (1988). Exercise and liver disease. Sports Med 6, 121–126.

Rizzuto, E., Pisu, S., Musarò, A., and Del Prete, Z. (2015). Measuring Neuromuscular Junction Functionality in the SOD1(G93A) Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Ann Biomed Eng *43*, 2196–2206.

Romijn, J.A., Coyle, E.F., Sidossis, L.S., Gastaldelli, A., Horowitz, J.F., Endert, E., and Wolfe, R.R. (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. Am. J. Physiol. *265*, E380–391.





Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., and Deng, H.X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature *362*, 59–62.

Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., et al. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. Neuron *16*, 675–686.

Roy, D., and Marette, A. (1996). Exercise induces the translocation of GLUT4 to transverse tubules from an intracellular pool in rat skeletal muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 147–152.

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

Russell, A.J., Hartman, J.J., Hinken, A.C., Muci, A.R., Kawas, R., Driscoll, L., Godinez, G., Lee, K.H., Marquez, D., Browne, W.F., et al. (2012). Activation of fast skeletal muscle troponin as a potential therapeutic approach for treating neuromuscular diseases. Nat. Med. *18*, 452–455.

Russell, A.P., Feilchenfeldt, J., Schreiber, S., Praz, M., Crettenand, A., Gobelet, C., Meier, C.A., Bell, D.R., Kralli, A., Giacobino, J.-P., et al. (2003). Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. Diabetes *52*, 2874–2881.

Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? J. Cell. Sci. *122*, 2179–2183.

Rutherford, N.J., Zhang, Y.-J., Baker, M., Gass, J.M., Finch, N.A., Xu, Y.-F., Stewart, H., Kelley, B.J., Kuntz, K., Crook, R.J.P., et al. (2008). Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. PLoS Genet. *4*, e1000193.

Salmons, S., and Vrbová, G. (1969). The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. J. Physiol. (Lond.) *201*, 535–549.

Sareen, D., O'Rourke, J.G., Meera, P., Muhammad, A.K.M.G., 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.

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.

Saxena, S., Cabuy, E., and Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. Nat. Neurosci. *12*, 627–636.

Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. Physiol. Rev. *91*, 1447–1531.

Schluter, J.M., and Fitts, R.H. (1994). Shortening velocity and ATPase activity of rat skeletal muscle fibers: effects of endurance exercise training. Am. J. Physiol. *266*, C1699–1673.

Schmidt-Nielsen, K. (1972). Locomotion: energy cost of swimming, flying, and running. Science *177*, 222–228.

Schwalm, C., Jamart, C., Benoit, N., Naslain, D., Prémont, C., Prévet, J., Van Thienen, R., Deldicque, L., and Francaux, M. (2015). Activation of autophagy in human skeletal muscle is dependent on exercise intensity and AMPK activation. FASEB J. *29*, 3515–3526.

Shefner, J.M., Watson, M.L., Meng, L., Wolff, A.A., and Neals/Cytokinetics STUDY Team (2013). A study to evaluate safety and tolerability of repeated doses of tirasemtiv in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener *14*, 574–581.





Shibata, N. (2001). Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. Neuropathology *21*, 82–92.

Siddique, T., Figlewicz, D.A., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Rouleau, G., Jeffers, A.J., Sapp, P., Hung, W.Y., Bebout, J., and McKenna-Yasek, D. (1991a). Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. N. Engl. J. Med. *324*, 1381–1384.

Siddique, T., Hu, P., Hentati, A., Deng, G., Hung, W.Y., McInnis, M.G., Warren, A.C., Rimmler, J., Antonarakis, S., and Pericak-Vance, M.A. (1991b). A molecular genetic approach to amyotrophic lateral sclerosis. Int. J. Neurol. *25-26*, 60–69.

Siddons, M.A., Pickering-Brown, S.M., Mann, D.M., Owen, F., and Cooper, P.N. (1996). Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism frequencies in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci. Lett. *208*, 65–68.

Siu, P.M., Donley, D.A., Bryner, R.W., and Alway, S.E. (2004). Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training. J. Appl. Physiol. *97*, 277–285.

Smiles, W.J., Areta, J.L., Coffey, V.G., Phillips, S.M., Moore, D.R., Stellingwerff, T., Burke, L.M., Hawley, J.A., and Camera, D.M. (2015). Modulation of autophagy signaling with resistance exercise and protein ingestion following short-term energy deficit. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *309*, R603–612.

Smith, R.A., Miller, T.M., Yamanaka, K., Monia, B.P., Condon, T.P., Hung, G., Lobsiger, C.S., Ward, C.M., McAlonis-Downes, M., Wei, H., et al. (2006). Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. J. Clin. Invest. *116*, 2290–2296.

Smittkamp, S.E., Morris, J.K., Bomhoff, G.L., Chertoff, M.E., Geiger, P.C., and Stanford, J.A. (2014). SOD1-G93A mice exhibit muscle-fiber-type-specific decreases in glucose uptake in the absence of whole-body changes in metabolism. Neurodegener Dis *13*, 29–37.

Sondell, M., Sundler, F., and Kanje, M. (2000). Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. Eur. J. Neurosci. *12*, 4243–4254.

Spencer-Jones, N.J., Ge, D., Snieder, H., Perks, U., Swaminathan, R., Spector, T.D., Carter, N.D., and O'Dell, S.D. (2006). AMP-kinase alpha2 subunit gene PRKAA2 variants are associated with total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol and high-density lipoprotein-cholesterol in normal women. J. Med. Genet. *43*, 936–942.

Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., et al. (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Science *319*, 1668–1672.

Srere, P.A., Mattiasson, B., and Mosbach, K. (1973). An immobilized three-enzyme system: a model for microenvironmental compartmentation in mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *70*, 2534–2538.

Stathopulos, P.B., Rumfeldt, J. a. O., Scholz, G.A., Irani, R.A., Frey, H.E., Hallewell, R.A., Lepock, J.R., and Meiering, E.M. (2003). Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 7021–7026.

Stepto, N.K., Benziane, B., Wadley, G.D., Chibalin, A.V., Canny, B.J., Eynon, N., and McConell, G.K. (2012). Short-term intensified cycle training alters acute and chronic responses of PGC1 $\alpha$  and Cytochrome C oxidase IV to exercise in human skeletal muscle. PLoS ONE *7*, e53080.





Stipa, G., Taiuti, R., De Scisciolo, G., Arnetoli, G., Tredici, M.R., Biondi, N., Barsanti, L., and Lolli, F. (2006). Sporadic amyotrophic lateral sclerosis as an infectious disease: a possible role of cyanobacteria? Med. Hypotheses *67*, 1363–1371.

Strong, M.J., Volkening, K., Hammond, R., Yang, W., Strong, W., Leystra-Lantz, C., and Shoesmith, C. (2007). TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. Mol. Cell. Neurosci. *35*, 320–327.

Stroupe, C. (2011). Autophagy: cells SNARE selves. Curr. Biol. 21, R697–699.

Suikkari, A.M., Sane, T., Seppälä, M., Yki-Järvinen, H., Karonen, S.L., and Koivisto, V.A. (1989). Prolonged exercise increases serum insulin-like growth factor-binding protein concentrations. J. Clin. Endocrinol. Metab. *68*, 141–144.

Sutedja, N.A., Sinke, R.J., Van Vught, P.W.J., Van der Linden, M.W., Wokke, J.H.J., Van Duijn, C.M., Njajou, O.T., Van der Schouw, Y.T., Veldink, J.H., and Van den Berg, L.H. (2007). The association between H63D mutations in HFE and amyotrophic lateral sclerosis in a Dutch population. Arch. Neurol. *64*, 63–67.

Sutedja, N.A., Veldink, J.H., Fischer, K., Kromhout, H., Heederik, D., Huisman, M.H.B., Wokke, J.H.J., 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.

Syková, E., and Chvátal, A. (2000). Glial cells and volume transmission in the CNS. Neurochem. Int. *36*, 397–409.

Taioli, E. (2007). All causes of mortality in male professional soccer players. Eur J Public Health *17*, 600–604.

Tateno, M., Sadakata, H., Tanaka, M., Itohara, S., Shin, R.-M., Miura, M., Masuda, M., Aosaki, T., Urushitani, M., Misawa, H., et al. (2004). Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. Hum. Mol. Genet. *13*, 2183–2196.

Taylor, A.M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., and Jeon, N.L. (2005). A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. Nature Methods *2*, 599–605.

Teng, Y.D., Benn, S.C., Kalkanis, S.N., Shefner, J.M., Onario, R.C., Cheng, B., Lachyankar, M.B., Marconi, M., Li, J., Yu, D., et al. (2012). Multimodal actions of neural stem cells in a mouse model of ALS: a meta-analysis. Sci Transl Med *4*, 165ra164.

Teyssou, E., Takeda, T., Lebon, V., Boillée, S., Doukouré, B., Bataillon, G., Sazdovitch, V., Cazeneuve, C., Meininger, V., LeGuern, E., et al. (2013). Mutations in SQSTM1 encoding p62 in amyotrophic lateral sclerosis: genetics and neuropathology. Acta Neuropathol. *125*, 511–522.

Therrien, M., and Parker, J.A. (2014). Worming forward: amyotrophic lateral sclerosis toxicity mechanisms and genetic interactions in Caenorhabditis elegans. Front Genet *5*, 85.

Therrien, M., Rouleau, G.A., Dion, P.A., and Parker, J.A. (2013). Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in C. elegans. PLoS ONE *8*, e83450.

Tiraby, C., and Langin, D. (2005). [PGC-1alpha, a transcriptional coactivator involved in metabolism]. Med Sci (Paris) *21*, 49–54.

Torres-Aleman, I., Barrios, V., and Berciano, J. (1998). The peripheral insulin-like growth factor system in amyotrophic lateral sclerosis and in multiple sclerosis. Neurology *50*, 772–776.





Tortelli, R., Conforti, F.L., Cortese, R., D'Errico, E., Distaso, E., Mazzei, R., Ungaro, C., Magariello, A., Gambardella, A., Logroscino, G., et al. (2013). Amyotrophic lateral sclerosis: a new missense mutation in the SOD1 gene. Neurobiol. Aging *34*, 1709.e3–5.

Tosca, L., Chabrolle, C., and Dupont, J. (2008). [AMPK: a link between metabolism and reproduction?]. Med Sci (Paris) 24, 297–300.

Towbin, H., and Gordon, J. (1984). Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. J. Immunol. Methods 72, 313–340.

Traynor, B.J., Codd, M.B., Corr, B., Forde, C., Frost, E., and Hardiman, O. (1999). Incidence and prevalence of ALS in Ireland, 1995-1997: a population-based study. Neurology *52*, 504–509.

Trejo, J.L., Llorens-Martín, M.V., and Torres-Alemán, I. (2008). The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. Mol. Cell. Neurosci. *37*, 402–411.

Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N.C., Brown, R.H., and Hediger, M.A. (1999). SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. Nat. Neurosci. *2*, 427–433.

Tsuchiya, Y., Ando, D., Takamatsu, K., and Goto, K. (2015). Resistance exercise induces a greater irisin response than endurance exercise. Metab. Clin. Exp. *64*, 1042–1050.

Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett. 333, 169–174.

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, 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. Neurosci. Lett. *350*, 132–136.

Turner, B.J., Parkinson, N.J., Davies, K.E., and Talbot, K. (2009). Survival motor neuron deficiency enhances progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. Neurobiol. Dis. *34*, 511–517.

Turner, B.J., Ackerley, S., Davies, K.E., and Talbot, K. (2010). Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. Human Molecular Genetics *19*, 815–824.

Ulbricht, A., Gehlert, S., Leciejewski, B., Schiffer, T., Bloch, W., and Höhfeld, J. (2015). Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. Autophagy *11*, 538–546.

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.

Valdmanis, P.N., and Rouleau, G.A. (2008). Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 70, 144–152.

Valenti, M., Pontieri, F.E., Conti, F., Altobelli, E., Manzoni, T., and Frati, L. (2005). Amyotrophic lateral sclerosis and sports: a case-control study. Eur. J. Neurol. *12*, 223–225.

Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, 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.





Vandenberghe, W., Robberecht, W., and Brorson, J.R. (2000). AMPA receptor calcium permeability, GluR2 expression, and selective motoneuron vulnerability. J. Neurosci. 20, 123–132.

Veldink, J.H., Kalmijn, S., Van der Hout, A.H., Lemmink, H.H., Groeneveld, G.J., Lummen, C., Scheffer, H., Wokke, J.H.J., and Van den Berg, L.H. (2005). SMN genotypes producing less SMN protein increase susceptibility to and severity of sporadic ALS. Neurology *65*, 820–825.

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.

Verstraete, E., Veldink, J.H., Huisman, M.H.B., Draak, T., Uijtendaal, E.V., Van der Kooi, A.J., Schelhaas, H.J., De Visser, M., Van der Tweel, I., and Van den Berg, L.H. (2012). Lithium lacks effect on survival in amyotrophic lateral sclerosis: a phase IIb randomised sequential trial. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. *83*, 557–564.

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.

Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013a). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part I, background and methods. Brain Behav *3*, 335–350.

Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013b). Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. Brain Behav *3*, 431–457.

Vlug, A.S., Teuling, E., Haasdijk, E.D., French, P., Hoogenraad, C.C., and Jaarsma, D. (2005). ATF3 expression precedes death of spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis-SOD1 transgenic mice and correlates with c-Jun phosphorylation, CHOP expression, somato-dendritic ubiquitination and Golgi fragmentation. Eur. J. Neurosci. *22*, 1881–1894.

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.

Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2009). Pathophysiology of neurodegeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. Curr. Mol. Med. *9*, 255–272.

Vucic, S., Krishnan, A.V., and Kiernan, M.C. (2007). Fatigue and activity dependent changes in axonal excitability in amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. *78*, 1202–1208.

Vukosavic, S., Dubois-Dauphin, M., Romero, N., and Przedborski, S. (1999). Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurochem. *73*, 2460–2468.

Wang, L., Deng, H.-X., Grisotti, G., Zhai, H., Siddique, T., and Roos, R.P. (2009). Wild-type SOD1 overexpression accelerates disease onset of a G85R SOD1 mouse. Hum. Mol. Genet. *18*, 1642–1651.

Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P.J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J.R., and Klip, A. (1999). Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. Mol. Cell. Biol. *19*, 4008–4018.

Wang, X., Fan, H., Ying, Z., Li, B., Wang, H., and Wang, G. (2010). Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. Neurosci. Lett. *469*, 112–116.





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.

Watson, M.R., Lagow, R.D., Xu, K., Zhang, B., and Bonini, N.M. (2008). A drosophila model for amyotrophic lateral sclerosis reveals motor neuron damage by human SOD1. J. Biol. Chem. 283, 24972–24981.

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.

Wei, R., Bhattacharya, A., Hamilton, R.T., Jernigan, A.L., and Chaudhuri, A.R. (2013). Differential effects of mutant SOD1 on protein structure of skeletal muscle and spinal cord of familial amyotrophic lateral sclerosis: role of chaperone network. Biochem. Biophys. Res. Commun. *438*, 218–223.

Weidberg, H., Shvets, E., and Elazar, Z. (2011). Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. Annu. Rev. Biochem. *80*, 125–156.

Weinreb, O., Amit, T., Bar-Am, O., and Youdim, M.B.H. (2010). Rasagiline: a novel anti-Parkinsonian monoamine oxidase-B inhibitor with neuroprotective activity. Prog. Neurobiol. *92*, 330–344.

Weiss, R.A., and Karpovich, P.V. (1946). Variability in the energy cost of standard exercises. Fed. Proc. *5*, 111.

Wicks, P., Vaughan, T.E., Massagli, M.P., and Heywood, J. (2011). Accelerated clinical discovery using self-reported patient data collected online and a patient-matching algorithm. Nat. Biotechnol. *29*, 411–414.

Wiedau-Pazos, M., Goto, J.J., Rabizadeh, S., Gralla, E.B., Roe, J.A., Lee, M.K., Valentine, J.S., and Bredesen, D.E. (1996). Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. Science *271*, 515–518.

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. J. Neurochem. *80*, 616–625.

Wilczak, N., De Vos, R.A.I., and De Keyser, J. (2003). Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Lancet *361*, 1007–1011.

Wilkins, A., Majed, H., Layfield, R., Compston, A., and Chandran, S. (2003). Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. J. Neurosci. *23*, 4967–4974.

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.

Wirth, M., Joachim, J., and Tooze, S.A. (2013). Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. Semin. Cancer Biol. 23, 301–309.

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.

Woodhoo, A., and Sommer, L. (2008). Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. Glia *56*, 1481–1490.





Worms, P.M. (2001). The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. J. Neurol. Sci. *191*, 3–9.

Wu, X., He, L., Chen, F., He, X., Cai, Y., Zhang, G., Yi, Q., He, M., and Luo, J. (2014). Impaired autophagy contributes to adverse cardiac remodeling in acute myocardial infarction. PLoS ONE *9*, e112891.

Wyman, T., Rohrer, D., Kirigiti, P., Nichols, H., Pilcher, K., Nilaver, G., and Machida, C. (1999). Promoter-activated expression of nerve growth factor for treatment of neurodegenerative diseases. Gene Ther. *6*, 1648–1660.

Xiao, S., McLean, J., and Robertson, J. (2006). Neuronal intermediate filaments and ALS: a new look at an old question. Biochim. Biophys. Acta *1762*, 1001–1012.

Xiao, Y., Ma, C., Yi, J., Wu, S., Luo, G., Xu, X., Lin, P.-H., Sun, J., and Zhou, J. (2015). Suppressed autophagy flux in skeletal muscle of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model during disease progression. Physiol Rep 3.

Xin, C., Liu, J., Zhang, J., Zhu, D., Wang, H., Xiong, L., Lee, Y., Ye, J., Lian, K., Xu, C., et al. (2015). Irisin improves fatty acid oxidation and glucose utilization in type 2 diabetes by regulating the AMPK signaling pathway. Int J Obes (Lond).

Xiong, X.-Q., Chen, D., Sun, H.-J., Ding, L., Wang, J.-J., Chen, Q., Li, Y.-H., Zhou, Y.-B., Han, Y., Zhang, F., et al. (2015). FNDC5 overexpression and irisin ameliorate glucose/lipid metabolic derangements and enhance lipolysis in obesity. Biochim. Biophys. Acta *1852*, 1867–1875.

Yagyu, H., Lutz, E.P., Kako, Y., Marks, S., Hu, Y., Choi, S.Y., Bensadoun, A., and Goldberg, I.J. (2002). Very low density lipoprotein (VLDL) receptor-deficient mice have reduced lipoprotein lipase activity. Possible causes of hypertriglyceridemia and reduced body mass with VLDL receptor deficiency. J. Biol. Chem. *277*, 10037–10043.

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. Nature Neuroscience *11*, 251–253.

Yardley, J.E., Sigal, R.J., Perkins, B.A., Riddell, M.C., and Kenny, G.P. (2013). Resistance exercise in type 1 diabetes. Can J Diabetes 37, 420–426.

Yokoseki, A., Shiga, A., Tan, C.-F., Tagawa, A., Kaneko, H., Koyama, A., Eguchi, H., Tsujino, A., Ikeuchi, T., Kakita, A., et al. (2008). TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *63*, 538–542.

Yoon, Y.H., Cho, K.S., Hwang, J.J., Lee, S.-J., Choi, J.A., and Koh, J.-Y. (2010). Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *51*, 6030–6037.

Yoshioka, T., Inagaki, K., Noguchi, T., Sakai, M., Ogawa, W., Hosooka, T., Iguchi, H., Watanabe, E., Matsuki, Y., Hiramatsu, R., et al. (2009). Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1alpha gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. *381*, 537–543.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., and Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 15077–15082.

Zala, D., Hinckelmann, M.-V., Yu, H., Lyra da Cunha, M.M., Liot, G., Cordelières, F.P., Marco, S., and Saudou, F. (2013). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. Cell *152*, 479–491.





Zhang, T., Hwang, H.-Y., Hao, H., Talbot, C., and Wang, J. (2012). Caenorhabditis elegans RNA-processing protein TDP-1 regulates protein homeostasis and life span. J. Biol. Chem. 287, 8371–8382.

Zhang, X., Li, L., Chen, S., Yang, D., Wang, Y., Zhang, X., Wang, Z., and Le, W. (2011). Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Autophagy *7*, 412–425.

Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. Cell Metab. *6*, 472–483.

Zhao, W., Varghese, M., Yemul, S., Pan, Y., Cheng, A., Marano, P., Hassan, S., Vempati, P., Chen, F., Qian, X., et al. (2011). Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1alpha (PGC- $1\alpha$ ) improves motor performance and survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Mol Neurodegener *6*, 51.

Zhao, Z., Sui, Y., Gao, W., Cai, B., and Fan, D. (2015). Effects of diet on adenosine monophosphateactivated protein kinase activity and disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. J. Int. Med. Res. *43*, 67–79.

Zhou, J., Yi, J., Fu, R., Liu, E., Siddique, T., Ríos, E., and Deng, H.-X. (2010). Hyperactive intracellular calcium signaling associated with localized mitochondrial defects in skeletal muscle of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. J. Biol. Chem. *285*, 705–712.

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. Psychiatr. *79*, 33–37.

Zu, T., Liu, Y., Bañez-Coronel, M., Reid, T., Pletnikova, O., Lewis, J., Miller, T.M., Harms, M.B., Falchook, A.E., Subramony, S.H., et al. (2013). RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *110*, E4968–4977.















# Physical exercise reduces cardiac defects in type 2 spinal muscular atrophy-like mice

Olivier Biondi<sup>1</sup>, Philippe Lopes<sup>1,2</sup>, Céline Desseille<sup>1</sup>, Julien Branchu<sup>1</sup>, Farah Chali<sup>1</sup>, Amina Ben Salah<sup>1</sup>, Claude Pariset<sup>1</sup>, Christophe Chanoine<sup>1</sup> and Frédéric Charbonnier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, PRES Sorbonne Paris-Cité, Centre d'étude de la sensorimotricité, UMR 8194 CNRS, 45 rue des Saints Pères, 75270 Paris Cedex 06, France

<sup>2</sup> Université d'Evry, Boulevard Francois Mitterrand, Evry, France

### Key points

- The present study provides evidence that the cardiomyopathy observed in spinal muscular atrophy (SMA) model mice is mainly due to intrinsic cardiac alteration but not to autonomic impairment.
- We demonstrated a non-pathological sympathetic activity on the heart of type 2 SMA-like mice, which likely counteracts the dramatic alteration of the cardiac function, such as arrhythmia and reduced heart rate.
- We demonstrated for the first time that physical exercise partially restores cardiac conduction efficiency, prevents fibrosis, attenuates defects in protein expression, bradycardia and arrhythmias leading to the partial recovery of heart and respiratory rates in exercised SMA-like mice.
- This study indicates a profound involvement of cellular, structural and vascular cardiac dysfunction in the pathogenesis of SMA, widely opening alternative pharmacological and non-pharmacological therapeutic strategies that would most certainly include physical exercise.

Abstract Spinal muscular atrophy (SMA), the leading genetic cause of death in infants worldwide, is due to the misexpression of the survival of motor neuron protein, causing death of motor neurons. Several clinical symptoms suggested that, in addition to motor neurons, the autonomic nervous systems could be implicated in the cardiac function alterations observed in patienst with SMA. These alterations were also found in a severe SMA mouse model, including bradycardia and a reduction of sympathetic innervation, both associated with autonomic imbalance. In the present study, we investigate the extent of autonomic dysfunction and the effects of a running-based exercise on the altered cardiorespiratory function in type 2 SMA-like mice. We observed that the SMA induced: (1) a dramatic alteration of intrinsic cardiac conduction associated with bradycardia; (2) a severe cardiomyopathy associated with extensive ventricular fibrosis; and (3) a delay in cardiac muscle maturation associated with contractile protein expression defects. Furthermore, our data indicate that the sympathetic system is not only functioning, but also likely contributes to alleviate the bradycardia and the arrhythmia in SMA-like mice. Moreover, physical exercise provides many benefits, including the reduction of cardiac protein expression defect, the reduction of fibrosis, the increase in cardiac electrical conduction velocity, and the drastic reduction in bradycardia and arrhythmias resulting in the partial restoration of the cardiac function in these mice. Thus, modulating the cardiorespiratory function in SMA could

Pn

Neuroscience

O. Biondi and P. Lopes are joint first authors.

represent a new target for improving supportive care and for developing new pharmacological and non-pharmacological interventions that would most certainly include physical exercise.

(Received 19 June 2012; accepted after revision 22 August 2012; first published online 28 August 2012) **Corresponding authors** O. Biondi and P. Lopes: Universite Paris Descartes – CESEM UMR 8194, 45 rue des Saints Peres, Paris 75006, France. Email: olivier.biondi@parisdescartes.fr and philippe.lopes@parisdescartes.fr

**Abbreviations** ANS, autonomic nervous system; AV, atrioventricular; BW, body weight; ECG, electrocardiogram; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HE, haematoxylin eosine; HF, high-frequency; HR, heart rate; HRV, heart rate variability; IVS, intraventricular septum; MyHC, myosin heavy chain; PCR, polymerase chain reaction; RMSSD, root mean square of successive RR interval differences; SA, sinoatrial; SMA, spinal muscular atrophy; SMN, survival of motor neuron; TBS, Tris-buffered saline.

### Introduction

Childhood spinal muscular atrophy (SMA) is a neurodegenerative disease with progressive muscular weakness and atrophy due to a loss of spinal cord motor neurons. No effective therapy is presently available for SMA, which represents a leading cause of death in childhood. SMA can be classified into three types, i.e. type 1 (most severe), type 2 and type 3 (least severe), on the basis of age of onset and functional status (Oskoui & Kaufmann, 2008). Patients with SMA have progressive respiratory muscle weakness that prevents their survival beyond infancy in type 1 SMA without ventilatory support, and beyond adolescence in type 2 SMA, often due to respiratory failure (Kostova *et al.* 2007).

In addition to directly affecting respiratory muscles via motor neuron degeneration, SMA may affect the autonomic nervous system (ANS) that regulates both the respiratory and the cardiac functions (Bernardi et al. 2001). Indeed, several studies pointed out a potential SMA-induced imbalance of the sympathovagal activity in patients with SMA, including cardiac arrhythmia and excessive sweating (Bach, 2007), fluctuation of blood pressure and heart rate (HR; Hachiya et al. 2005), vasomotor and sudomotor autonomic dysfunctions (Arai et al. 2005), and abnormalities in vascular perfusion (Araujo Ade et al. 2009). The detection of cardiac arrhythmias and other cardiovascular dysfunction of the conduction system are provided through the classical electrocardiogram (ECG). Currently, very little information is available on the development of ECG patterns in SMA. Recent reports in SMA mouse models clearly indicate that low survival of motor neuron (SMN) protein levels, besides contributing to motor neuron loss, would lead to early and persistent cardiac dysfunction (Bevan et al. 2010; Heier et al. 2010). This cardiac dysfunction results in bradycardia, and in the development of dilated cardiomyopathy associated with a decrease in contractility (Bevan et al. 2010) and cardiac sympathetic innervation (Heier et al. 2010). It seems therefore that some degree of intrinsic cardiac dysfunction and sympathovagal imbalance occurs in the development of SMA. However, the nature of the SMA-induced autonomic system dysfunction remains unclear. Specifically, the overall contribution of the sympathetic and parasympathetic branches of the ANS in the pathogenesis of SMA needs to be elucidated. Furthermore, previous studies that have addressed the respiratory function in SMA-like mice gave rise to confusing results with, depending on the mouse model, either no impairment in respiratory rate (El-Khodor *et al.* 2008) or smaller ventilation levels with frequent and longer apnoea (Michaud *et al.* 2010). Because the respiratory function is also controlled by the ANS, analysing the involvement of cardiac sympathetic and parasympathetic influences along with respiratory rates in SMA and controls needs to be evaluated.

The ANS can be modulated by several well-described regulators of the autonomic function, one of which is physical exercise (Smith *et al.* 1989). Physical exercise induces long-term changes in sympathovagal balance of healthy subjects (De Meersman, 1993), and improves motor function and strength in neuromuscular diseases (Sveen *et al.* 2008), for which some are affected with autonomic function impairment (Yotsukura *et al.* 1998). Furthermore, we have recently reported that regular physical exercise is beneficial for type 2 SMA-like mice, as demonstrated by a significant increase in life span and motor capacities of exercised mice (Grondard *et al.* 2005).

In the present study, we analysed the effects of exercise on the intrinsic cardiac conduction, cardiomyocyte contractile unit proteins, and autonomic function during the postnatal period in wild-type and type 2 SMA-like mice (Hsieh-Li *et al.* 2000) using a non-invasive conscious mouse ECG screening system. Our data support the hypothesis that the heart of SMA-like mice is modulated by a functional sympathetic system, whose influence limits bradycardia and arrhythmia. Furthermore, we demonstrated for the first time that physical exercise improves cardiac function in type 2 SMA-like mice, through intrinsic cardiac conduction and contractile protein content modifications, prevention of cardiac fibrosis, bradycardia and arrhythmia.

### **Methods**

### Mice and treatment

The knock-out transgenic SMA-like mice ( $Smn^{\Delta 7/\Delta 7}$ ;  $SMN2^{+/-}$ ) were obtained from the Institute of Molecular Biology (Academia Sinica, Taipei, Taiwan). These mice derive from the SMN2 transgenic line from Hsieh-Li et al. (2000), which carry two SMN2 transgene copies as originally determined by Southern blots. These mice were subsequently purified in an FVB/NRj genetic background (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) for more than 10 generations. Heterozygous *Smn* knock-out (*Smn* $^{\Delta 7/+}$ ) mice were bred with heterozygous transgenic knock-out  $(Smn^{\Delta 7/+}; SMN2^{+/-})$  mice. Breeder mice that gave only type 2 SMA-like mice in their progeny were selected for this study as described previously (Grondard et al. 2005; Biondi et al. 2008). To standardize the type 2 phenotype, mutant mice with a weight ranging from 3 to 4 g at 8 days old were used for this study. The control mice were heterozygous knock-out for Smn with the human SMN2 transgenes ( $Smn^{\Delta 7/+}$ ; SMN2<sup>+/-</sup>). Control mice (n = 40) were compared with unexercised (n = 34) and exercised (n = 34) type 2 SMA-like mice.

ANS influences upon cardiorespiratory function were analysed by pharmacological inhibition of both sympathetic (atenolol) and parasympathetic (atropine) branches on conscious controls (n=8), unexercised (n=8) and exercised (n=8) type 2 SMA-like mice. Atropine (A0257-5G, Sigma-Aldrich, Germany) and atenolol (A7655-1G, Sigma-Aldrich) were intraperitoneally injected in conscious animals, 45 min after the start of ECG recording, with  $2 \mu g g^{-1}$  and  $1 \mu g g^{-1}$ doses of 50 mg ml<sup>-1</sup> and 0.3 mg ml<sup>-1</sup> diluted in NaCl 0.9% solutions, respectively. At P12 and/or after experiments, animals were anaesthetized with an intraperitoneal dose of sodium pentobarbitone (40 mg kg<sup>-1</sup>), and were killed by an overdose of anaesthetics.

The care and treatment of animals followed the national authority (Ministère de la Recherche et de la Technologie, France) and the animal welfare committee guidelines for the detention, use and the ethical treatment of laboratory animals at Paris Descartes University. Our animal experiments followed the principles of United Kingdom regulations, as described by Drummond (Drummond, 2009).

### **Exercise protocol**

Exercise was performed in an elastomer-covered wheel with a controlled speed essentially as described previously (Grondard *et al.* 2005). The protocol was started at 8 days old. The type 2 SMA-like mice (n = 34) were progressively accustomed to wheel exercise for a period of 2 days (first day, four periods of 5 min running separated by rest peri-

ods of 30 min; second day, two periods of 10 min running separated by a rest period of 30 min). Then, the mice were continuously exercised, individually, for 20 min day<sup>-1</sup>. The speed was fixed at 2 m min<sup>-1</sup> for the first 2 days, and then progressively increased by 1 m min<sup>-1</sup> every day, reaching 4 m min<sup>-1</sup> on the fourth and final exercise day at P12.

#### **Radiotelemetry system and temperature control**

The radiotelemetry system used in this study allowed for ECG recordings in freely moving control (n = 15), unexercised (n=15) and exercised (n=15) type 2 SMA-like mice. The system consisted of flat transmitters (TA10ETA-F20; Data Sciences International, St Paul, MN, USA) with two electrodes filled with cardiac gel and placed on the skin of pups. The platform receivers were placed in a chamber  $(50 \times 50 \times 25 \text{ cm})$  kept at a constant temperature of  $30 \pm 0.2^{\circ}$ C during the entire recording period using a precise temperature-controlled air heater (Air-Therm ATX, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Because HR and HR variability (HRV) are directly influenced by temperature in adult mice (Swoap *et al.* 2008), keeping a constant 30°C temperature allowed the maintenance of mice nesting temperatures. The temperature in the nest could be considered as a thermoneutrality state where very little fluctuations in HR and HRV occur. When measured at a constant 30°C, the pups had very little or no activity, allowing the constitution of a HR plateau where five successive periods of 2 min data were collected for further HRV analysis. Obtaining stationary data constitutes one of the requirements for frequency domain analysis of HRV (Task Force, 1996).

### ECG data acquisition and processing

A Lead II configuration was used in order to provide large-amplitude deflection in the ECG signal. ECG signals were fed to a PC containing the Dataquest A.R.T. 4.1 data acquisition and analysis system (Data Sciences International) for monitoring and acquisition of ECG waves. ECG records showing more than 5% of abnormal beats were excluded from the study. For all experiments, the mice were placed in the 30°C heated chamber for a minimum period of 30 min. Five successive periods of stable 2 min stationary ECG signal with no erratic fluctuations were chosen between the 30th and 60th min, linear interpolated and resampled to a 20 Hz interbeat time series, together with Hamming windowing, providing better accuracy at regions close to the frequency limits of the available power spectrum (Stoica & Moses, 1997). For the pharmacological study, the analysis was performed just before the injection, and between the 20th and 30th min post-injection.

### ECG cycle analysis

The ECG cycle analysis included the PR interval, QRS complex, QT interval and corrected QT (QTc) that were calculated from the average of three non-consecutive cardiac cycles over a 2 min recording period in unexercised and exercised control and SMA-like mice at P12. PR interval was measured from the beginning of the P-wave to the beginning of the QRS complex. The PR segment was calculated from the end of the P-wave to the beginning of the QRS complex. The QRS complex duration was measured from the first deflection of the Q-wave to the end of the S-wave. The QT interval was measured from the beginning of the QRS complex to the end of the T-wave. The RR interval was taken as the mean RR interval over the 3 min recording period, and the corrected QT interval (OTc) was calculated by using the following conversion formula: QTc = QT/SQRT(RR/1000) (Mitchell *et al.* 1998).

### **ECG** variability analysis

The cardiovascular variability analysis was performed using customized HRV analysis software (Niskanen *et al.* 2004). HRV data were analysed in both time and frequency domains using standard HRV parameters. In the time domain, the following HRV parameters were quantified: (1) mean of HR (HR, beats min<sup>-1</sup>); (2) root mean square of successive RR interval differences (RMSSD, ms) (Task Force, 1996). In the frequency domain, the cut-off frequencies for mice have recently been proposed (Baudrie *et al.* 2007; Thireau *et al.* 2008), and the following components have been recommended to gauge both the sympathetic and parasympathetic components of HRV: low-frequency (0.4–1.5 Hz, ms<sup>2</sup>); and high-frequency (HF: 1.5–5.0 Hz, ms<sup>2</sup>) (Task Force, 1996; Eckberg, 1997).

### **Protein and Western blot analysis**

Control (n = 9), unexercised (n = 3) and exercised (n = 3)type 2 SMA-like mice were anaesthetized with an intraperitoneal dose of sodium pentobarbitone  $(40 \text{ mg kg}^{-1})$ and, when the paw pressure reflex response was no longer observed, the beating hearts were dissected, put in a cold 0.9% NaCl solution (+4°C) for 1 min and then frozen in cold isopentane (-80°C). Heart samples (25–50 mg) were homogenized in 100  $\mu$ l/5 mg tissues of ice-cold RIPA buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 0.1% SDS; 0.5% sodium deoxycholate; 1% NP40; 5 mM EDTA pH 8.0; 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF; Sigma-Aldrich); 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> leupeptin;  $50 \,\mu \text{g}\,\text{ml}^{-1}$  pepstatin A;  $50 \,\mu \text{g}\,\text{ml}^{-1}$  aprotinin]. Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 min, 12,300 g) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Marne-La-Coquette, France). Protein samples  $(10 \,\mu g)$  of each homogenate were submitted to 12.5% SDS-PAGE electrophoresis (1.5 M Tris pH 8.3, 12.5% acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.06% TEMED). The separated proteins were transferred on polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad) according to Towbin et al. (1984). Equal loading of samples was checked by Ponceau dye staining of the transferred gels. Western blot analysis was performed on membranes overnight at 4°C in 4% BSA, 0.05% Tween 20, Tris-buffered saline (TBS) pH 7.4. Each of the following primary antibodies, including monoclonal mouse anti-troponin I (1:500; HyTest Ltd, Finland) and monoclonal mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (1: 5,000; Chemicon, Molsheim, France), was incubated overnight at 4°C in the above blocking medium. Membranes were rinsed in 0.1% Tween 20 in TBS for  $3 \times 10$  min at room temperature, and then incubated in horseradish peroxidase-conjugated goat secondary antibody directed against mouse immunoglobulins (1: 5000; Bio-Rad Laboratories) in 0.05% Tween 20 in TBS for 1 h at room temperature. Bound antibody complexes were developed using the ECL system (Amersham Biotech., Saclay, France) and exposed to hyperfilm ECL-plus X ray film (Amersham Biotech.). Films were quantified with ImageJ v1.43 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and the results reported as means  $\pm$  SD.

## Quantitative real time polymerase chain reaction (PCR) analysis

Total mRNA was extracted from frozen control (n = 4), unexercised (n=4) and exercised (n=4) type 2 SMA-like hearts using TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Sain-Aubin, France). One microgram was reverse-transcribed with random primers from Promega (Promega France, Charbonnières, France) and reverse transcriptase M-MLV-RT from Invitrogen. Quantitative real time PCR was performed with standard protocols using SYBRGreen ROX Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) as a fluorescent detection dye in ABI PRISM 7000 in a final volume of  $10 \,\mu$ l, which also contains  $300 \,\text{nM}$ of the following primers (Operon, Cologne, Germany): GAPDH: F: 5'-GTG GAC CTC ATG GCC TAC AT-3'; R: 5'-TGT GAG GGA GAT GCT CAG TG-3'; α myosin heavy chain (MyHC): F: 5'-CC TGA GCA CAG AGC TCT TCA AA-3'; R: 5'-GT GCA CGT TTT TTC CCC CTT CT-3';  $\beta$  MyHC: F: 5'-CTA CAG GCC TGG GCT TAC CT-3'; R: 5'-TCT CCT TCT CAG ACT TCC GC-3'.

The relative amounts of DNA in samples were determined on the basis of the threshold cycle for each PCR product ( $C_t$ ). Samples were compared using the relative  $C_t$  method, where the amount of target normalized to the amount of endogenous control GAPDH and relative to the control sample is given by  $2^{-\Delta\Delta G_t}$ .

### **Histological analysis**

Control (n = 4), unexercised (n = 4) and exercised (n = 4)type 2 SMA-like mice were anaesthetized with an intraperitoneal dose of sodium pentobarbitone  $(40 \text{ mg kg}^{-1})$ and, when the paw pressure reflex response was no longer observed, the beating hearts were dissected and placed in a high calcium buffer to induce a cardiac arrest in the diastolic contraction phase. Hearts were then frozen in cold isopentane and maintained at -80°C in dry ice. Frozen sections  $(8 \,\mu m)$  were stained either by histological haematoxylin eosine (HE) staining, or by Sirius Red staining, dehydrated via an alcohol gradient (70, 90 and 100%) and mounted with Eukitt (VWR International, Strasbourg, France). The heart images were entirely analysed, and the pictures of each muscle were assembled using Adobe Photoshop v. CS5 for each mouse group.

#### Microscopy

All immunofluorescence images were collected with a CCD camera (QImaging Retiga 2000R Fast; Cooled Mono 12 bit) coupled with a RGB filter and mounted on an Olympus microscope (BX51, Rungis, France) using the Image Pro-Plus, v. 6.0, software (Media Cybernetics, Buckinghamshire, United Kingdom) with 200 ( $20 \times$  Olympus objective FL N 0.5) and 400 ( $40 \times$  Olympus objective UPlan FL N 0.75) magnifications.

#### **Statistical analysis**

Data were analysed with the SPSS 17.0 statistical package (SPSS, Chicago, IL, USA). All parameters are expressed as mean  $\pm$  SD. All data passed the Shapiro–Wilk normality test. For the analysis of cardio-respiratory parameters from P6 to P12, a two-way repeated-measures ANOVA, on both mice group and age factors, and the Holm–Sidak *post hoc* test were performed to verify significant differences between control and SMA-like mice. For all other comparisons, Student's *t* test was used to verify significant differences between unexercised and exercised SMA-like mice. Pearson's correlation analysis was performed between body weight (BW) and HR, and between BW and HF peak. Statistical significance was set at *P* < 0.05.

### Results

# HR and respiratory rates during the postnatal period in control and SMA-like mice

To investigate the cardiac function during the postnatal period, we measured HR in control and SMA-like mice in a  $+30^{\circ}$ C thermoregulated chamber at the asymptomatic age of P6, and from P9 to P12, where symptoms occur (Hsieh-Li *et al.* 2000). We found that, in controls, HR progressively increased with age from  $525 \pm 22$  beats min<sup>-1</sup> at P6, to  $602 \pm 44$  beats min<sup>-1</sup> at P12 (Fig. 1A and C). In contrast, in SMA-like mice, HR progressively decreased from  $384 \pm 27$  beats min<sup>-1</sup> to  $302 \pm 64$  beats min<sup>-1</sup> during the same period (Fig. 1B and C), with a huge fall of 60 beats min<sup>-1</sup> at P11, when compared with P10 (P < 0.05). Therefore, HR differences between controls and SMA-like mice increased with disease progression by about 141 beats min<sup>-1</sup> at P6 and 300 beats min<sup>-1</sup> at P12 (Fig. 1C).

We next investigated the respiratory function during the same period in control and SMA-like mice based on the frequency domain analysis of HRV. First, we analysed the HF component of the HRV, more specifically the frequency at which the HF peak occurs (Fig. 1*D* and *E*). In resting conditions, the HF peak provides a reliable estimation of the breathing rate (Hayano & Yasuma, 2003). We found that, in controls, the breathing rate significantly increased by about 50% from P6 to P12, corresponding to  $177 \pm 54$  breaths min<sup>-1</sup> and  $262 \pm 42$  breaths min<sup>-1</sup>, respectively (*P* < 0.001; Fig. 1*D* and *F*). In contrast, in SMA-like mice, there was a significant 20% decrease in HF peak with age, with the associated breathing rate falling from  $154 \pm 16$  breaths min<sup>-1</sup> at P6 to about  $120 \pm 24$  breaths min<sup>-1</sup> at P12 (*P* < 0.01; Fig. 1*E* and *F*).

These results suggested that both cardiac and respiratory functions are drastically impaired in SMA-like mice. However, a correlation analysis performed with all mice groups from all ages showed that both HR (Fig. 2A) and HF peak (Fig. 2B) are highly linked to BW  $(r^2 = 0.87 \text{ and } r^2 = 0.70, \text{ respectively, } P < 0.001).$ Indeed, the BW of control mice increased with age from  $4.4 \pm 0.7$  g at P6 to  $6.8 \pm 0.6$  g at P12, while the BW of SMA-like mice increased from P6 to P10 and then drastically decreased, falling from  $4.0 \pm 0.4$  g at P10 to  $3.1 \pm 0.7$  g at P12 (P < 0.05; Fig. 2C). Therefore, after standardization to BW, no significant differences were observed between control and SMA-like mice for both cardiac and respiratory functions at any age, with constant values approaching 100 beats min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (Fig. 2D) and about  $0.7 \text{ Hz g}^{-1}$  (Fig. 2*E*). These results indicate that bradycardia and the drop in respiratory frequency are proportional to the decrease in BW of type 2 SMA-like mice.

# Sympathetic system is functional in SMA-like mice and limits cardiac dysfunction

To determine the role of the autonomic function on the cardiac adaptation to mice growth in SMA, we performed time and frequency domain analyses of HRV in control and SMA-like mice from P6 to P12. While the HRV of control mice was stable with age, RMSSD doubled from



### Figure 1. Heart rates (HRs) and respiratory rates are progressively altered in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice at P12

A and *B*, representative ECGs (2 s) of control (*A*) and SMA-like mice (*B*) recorded during conscious and unrestrained conditions at 30°C. *C*, the RR intervals analysis shows progressive HR reduction during development in SMA-like mice compared with controls. *D* and *E*, power spectrum analysis of RR intervals derived from the five successive 2 min stationary RR data recorded in controls (*D*) and SMA-like mice (*E*). Based on the frequency at which the high-frequency (HF) peak occurs, the breathing rate of the mice is determined. *F*, breathing rate (HF peak) was reduced during development in SMA-like mice while it increased in controls. Error bars represent SD (n = 15 at P6, n = 15 at P9, n = 15 at P10, n = 15 at P11, n = 15 at P12; \*P < 0.05). LF, low-frequency; PSD, Power Spectrum Density.

In order to investigate the autonomic influence on HR in SMA-like mice at P6 and P12, we performed a specific inhibition of either the sympathetic nervous system by intraperitoneal injection of a  $\beta$ 1 adrenergic receptor

inhibitor (atenolol) or the parasympathetic nervous system by intraperitoneal injection of a muscarinic receptor inhibitor (atropine). Interestingly, the atropine injection induced no significant HR (Fig. 3*B* and *C*) and RMSSD (Fig. 3*D*) modification in control and SMA-like mice (P > 0.05) suggesting that, at these ages, the parasympathetic branch of the ANS had no impact



Figure 2. Adaptation of heart rates (HRs) and respiratory rates to growth of spinal muscular atrophy (SMA)-like mice

A and B, HRs (A) and respiratory (B) rates are correlated with body weight (BW) in control and SMA-like mice during development. C, BW progressively decreased with age in SMA-like mice compared with controls. D and E, standardized HR (D) and high-frequency (HF) peak (E) to BW show no significant difference during development between SMA-like mice and controls at any age. Error bars represent SD (n = 15 at P6, n = 15 at P9, n = 15 at P10, n = 15 at P11, n = 15 at P12; \*P < 0.05).





Figure 3. Cardiac arrhythmia in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice increases with age and is counteracted by a functional sympathetic nervous system

*A*, SMA-like mice show an increase in cardiac variability (root mean square of successive RR interval differences, RMSSD) from P10 to P12 compared with controls. *B*, a representative time–frequency analysis indicated no change in heart rate (HR) of SMA-like mice and controls at P12 following muscarinic receptor inhibition with atropine. *C* and *D*, no significant changes in HR (*C*) and RMSSD (*D*) were observed following atropine injection between SMA-like mice and controls at P12 following adrenergic receptor inhibition with atenolol. *F*, atenolol injection induced HR reduction in both control and SMA-like mice at P6 and P12. *G*, when standardized to body weight (BW), post-atenolol injection HR (PI. HR) was significantly different between SMA-like mice at any age. Error bars represent SD (n = 8 at P6 and n = 8 at P12; \*P < 0.05).

on HR and HRV, as previously shown (Sato, 2008). This result suggests that the increase of cardiac variability observed in SMA-like mice is not under the influence of the parasympathetic system.

After atenolol injection, a decrease in HR was observed for both control and SMA-like mice, which indicates that sympathetic influence on the heart is effective at these ages (Fig. 3E and F). Interestingly, the sympathetic activity decreased in control mice with age, with a loss of  $244 \pm 58$  beats min<sup>-1</sup> observed after injection at P6 and only  $178 \pm 24$  beats min<sup>-1</sup> at P12 (*P* < 0.05; Fig. 3*F*). In contrast, in SMA-like mice, the sympathetic influence was maintained at an elevated level for both ages, with a mean drop of about  $127 \pm 24$  beats min<sup>-1</sup> (P < 0.05; Fig. 3F). So, despite a decrease in absolute HR in SMA-like mice with age when compared with control mice, the decrease in cardiac frequency after atenolol injection was of the same magnitude compared with control mice. Moreover, when HR was standardized to BW, a 36% decrease in HR was found in SMA-like mice compared with controls (50 and 73 beats min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>, respectively; P < 0.05; Fig. 3*G*), whereas no difference was reported without sympathetic inhibition (Fig. 2D). These data seem to indicate no defect in sympathetic activity for SMA-like mice.

The cardiac variability analysis at P6 and P12 after atenolol injection revealed a significant increase in RMSSD in SMA-like mice at both ages (P < 0.05; Fig. 3H), whereas no significant modulation was detected in control mice at any age (Fig. 3H). Furthermore, cardiac variability after sympathetic inhibition in SMA-like mice increased by 300% at P12 when compared with P6, suggesting a direct link between the increase in variability and the disease progression. Taken together, these results suggest that sympathetic activity counteracts bradycardia and cardiac arrhythmia in SMA-like mice.

### Cardiac conduction duration is increased in SMA-like mice

To delineate the type of myocardium disturbances in SMA-like mice, we investigated the intrinsic cardiac function through the recording of PR intervals, QRS complex and corrected QT (QTc) in three non-consecutive cardiac cycles in control and SMA-like mice at P12 (Fig. 4*A* and *B*). Cardiac conduction characteristics showed an increase in conduction time between the sinoatrial (SA) and atrioventricular (AV) nodes of SMA-like mice, as indicated by the elongated PR interval ( $64.5 \pm 5.5$  ms in SMA and  $31.2 \pm 0.9$  ms in controls; *P* < 0.05; Fig. 4*C*). The ventricular depolarization times were also elongated, with a significant increase in QRS complex duration in SMA-like mice compared with controls ( $15.4 \pm 5.3$  ms and  $10.6 \pm 0.3$  ms, respectively; *P* < 0.05; Fig. 4*D*). However, no significant differences were found in the corrected

QT interval between SMA-like mice and controls  $(83.9 \pm 6.1 \text{ ms} \text{ and } 76.9 \pm 3.0 \text{ ms}, \text{ respectively; Fig. 4}E)$ . Taken together, these data further support the hypothesis of a severe bradycardia associated with cardiac conduction defects in SMA-like mice, as reported in other SMA mouse models (Heier *et al.* 2010).

### Contractile function is altered in the myocardium of SMA-like mice

Our laboratory (Biondi et al. 2008) and others (Kariya et al. 2008; Kong et al. 2009; Martínez-Hernández et al. 2009) have previously indicated a motor unit maturation delay observed at the skeletal motor unit level in type 2 SMA-like mice. We therefore questioned the potential cardiac developmental defects with a particular impact on the postnatal maturation of cardiomyocytes. We analysed the expression of two contractile unit proteins of the cardiomyocyte, also markers of cardiac postnatal development, namely, troponin I and MyHC. Troponin I is expressed in skeletal isoform during the embryonic stages and is progressively replaced by the cardiac troponin isoform during the postnatal period (Adamcova & Pelouch, 1999). For the MyHC, only the  $\beta$ -isoform is expressed during the early embryonic stage and then progressively replaced by the  $\alpha$ -isoform during the postnatal maturation (Lompre *et al.* 1984). The switch between  $\beta$ - and  $\alpha$ -MyHC reflects the adaptation of the cardiac contractile capacity to growth (Lompre et al. 1984). The expression patterns of troponin I were analysed by Western blot on cardiac extracts in control and SMA-like mice at P6, P8 and P12. Our results indicated a decrease in the expression of skeletal isoform of troponin I from P6 and P12 with, in particular, a 50% reduction in the heart of control mice between P8 and P12 (P < 0.05; Fig. 5A and B). The isoform shift was nearly completed at P18 (Supplementary Fig. 1). In contrast, we found a residual expression of the skeletal troponin I isoform in the heart of SMA-like mice, with a fivefold increase when compared with matched controls at P12 (P < 0.05; Fig. 5*C* and *D*).

We next analysed by quantitative PCR the expression profile of  $\beta$ - and  $\alpha$ -MyHC in the myocardium of controls and SMA-like mice at P6, P8 and P12. In controls, a significant 30% increase in the expression of  $\alpha$ -MyHC transcripts was found between P6 and P8 (P < 0.05; Fig. 5*E*), that paralleled a decrease in  $\beta$ -MyHC transcripts expression (Fig. 5*F*).  $\beta$ -MyHC expression, already found in minority at P6, decreased by more than fivefold until P12 (P < 0.05; Fig. 5*F*). In SMA-like mice,  $\alpha$ -MyHC was found downexpressed twofold when compared with controls (P < 0.05; Fig. 5*G*). We found, in parallel, a 1.5-fold decrease in  $\beta$ -MyHC expression that could suggest a loss of contractile components in cardiomyocytes of SMA-like mice at P12 (P < 0.05; Fig. 5*H*). This result seems to indicate a contractile protein expression defect.

These data prompted us to initiate a histological analysis of heart ventricles in SMA-like mice and controls at P12. After a transversal section in the middle of ventricles of stopped hearts in the diastole phase, HE staining confirmed specific structural defect in SMA-like mice when compared with matched control mice (Fig. 5*I* and *J*). Muscle ventricles from SMA-like mice appeared atrophic with a 50% decrease in total area compared with control hearts (P < 0.05; Fig. 5K). This decrease was coherent with a 50% loss in heart weight (Supplementary Fig. 2), BW (Fig. 2C) and a 40% decrease in the body size (data not shown) at P12 in these mice. When heart weight was standardized to BW (Supplementary Fig. 2), no significant difference was observed. Cardiomyocytes of SMA-like mice appeared disorganized, isolated, round and atrophic (Fig. 5J). Furthermore, the intraventricular septum (IVS) and both ventricular walls appeared thinner in SMA-like mice compared with control mice (P < 0.05; Fig. 5L-N), even when values were normalized with owner heart diameter. Finally, after Sirius Red staining, a high proportion of fibrosis was observed in the same ventricle sections of SMA-like mice (Fig. 5*P*), while no fibrosis was detected in control mice (Fig. 5*O*).

### Physical exercise partially corrects cardiac muscle breakdown in SMA-like mice

We next evaluated the effects of exercise on the expression profile of troponin I and  $\alpha$ - and  $\beta$ -MyHC in the myocardium of control and SMA-like mice at P12. Physical exercise induced a threefold decrease in the expression of the skeletal isoform of the troponin I in SMA-like mice compared with unexercised mice (P < 0.05; Fig. 6A and B), suggesting an exercise-induced promotion of the transition from skeletal to cardiac isoforms. Furthermore, exercise promoted the expression of both MyHC isoforms with, in particular: (1) a 50% increase in the expression of  $\alpha$ -MyHC in exercise-treated SMA nearly reaching control levels; and (2) a fourfold increase in the expression of



A and B, representative ECGs (6 ms) of control (A) and SMA-like mice (B) recorded during conscious and unrestrained conditions at  $30^{\circ}$ C. C-E, cardiac conduction analysis shows an increase in PR interval (C) and QRS complex duration (D) in SMA-like mice compared with control mice, while the corrected QT interval was not significantly different (E). Error bars represent SD (n = 15; a.u., arbitrary unit; \*P < 0.05).

#### Figure 5. Contractile protein expression and cardiac structure is affected in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice

A-D, Western blot analysis of the troponin I expression in the heart of control mice revealed a switch from skeletal to cardiac isoform with age (A and B, n = 3 at P6, P8 and P12), while the skeletal isoform remained overexpressed in SMA-like mice at P12 (C and D, n = 3). E–H, quantitative PCR analysis of the myosin heavy chain (MyHC) mRNA expression in the heart of control mice shows an increase in alpha isoform expression (E) and a decrease in beta isoform expression (F) with age, while the expression of both isoforms was downregulated in SMA-like mice at P12 (G and H, n = 4). I and J, HE staining of ventricles cross-sections in control (/) and SMA-like mice (J) at P12, with a zoom in each section. K, morphometric analyses of the ventricles show a dramatic decrease in heart area in SMA-like mice at P12. L–N. when standardized to heart diameter, the thickness of the intraventricular septum (IVS; L) and the wall of the right (RV; M) and left (LV; N) ventricles were decreased in SMA-like mice compared with control mice at P12 (n = 4). O and P, Sirius Red staining of ventricles cross-sections in control (O) and SMA-like mice (P) at P12, with a zoom in each section, show fibrosis in the heart of SMA-like mice only (n = 4). Error bars represent SD (a.u., arbitrary unit; \*P < 0.05). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



 ${\ensuremath{\mathbb C}}$  2012 The Authors. The Journal of Physiology  ${\ensuremath{\mathbb C}}$  2012 The Physiological Society



### Figure 6. Physical exercise partially corrects cardiac structure and contractile protein expression in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice at P12

A and *B*, physical exercise in SMA-like mice promoted the expression switch from skeletal to cardiac isoforms of troponin I (n = 3). *C* and *D*, physical exercise promoted the expression of  $\alpha$ - and  $\beta$ -myosin heavy chain (MyHC) isoforms both in control and SMA-like mice (n = 4). *E* and *F*, HE staining of ventricles cross-sections in unexercised SMA-like mice (*E*) and exercised SMA-like mice (*F*), with a zoom in each section. *G*–*J*, physical exercise in SMA-like mice significantly increased the heart area (*G*) and, when standardized to heart diameter, increased also the thickness of the intraventricular septum (IVS; *H*) and the wall of the right (RV; *I*) and left (LV; *J*) ventricles (n = 4). *K* and *L*, compared with unexercised SMA-like mice (*K*), the heart fibrosis was reduced in exercised SMA-like mice (L; n = 4). Error bars represent SD (a.u., arbitrary unit; \*P < 0.05). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

 $\beta$ -MyHC in exercised compared with unexercised SMA (P < 0.05; Fig. 6C and D).

As expected, the beneficial effects of the exercise programme were observed following histological analysis of the ventricular muscle from SMA-like mice (Fig. 6*E* and *F*). After exercise, all cardiac structural parameters appeared less affected than in sedentary counterparts. An increase of 15% in heart area (Fig. 6*G*) was observed, paralleling a 15% increase of the body size in exercised type 2 SMA-like compared with unexercised mice (data not shown). About 25% increase of normalized IVS thickness was observed in exercised heart of SMA-like mice, and the thickness of the ventricular walls was restored to near control values (P < 0.05; Fig. 6H-J). Finally, fibrosis was decreased in the heart of exercised SMA-like mice (Fig. 6*L*) when compared with unexercised SMA-like mice (Fig. 6*K*), as revealed by Sirius Red staining.

# Physical exercise improves cardiac function in SMA-like mice

At P12, time and frequency domain analyses of the HRV were next used to investigate the autonomic modulation induced by physical exercise in SMA-like mice. We found that the RMSSD significantly decreased in exercised SMA-like mice compared with unexercised counterparts (P < 0.05; Fig. 7A). Importantly, after the exercise period, no significant difference was found between exercised SMA-like mice and unexercised control mice for RMSSD, suggesting a restoration of the cardiac variability with exercise in SMA-like mice. Furthermore, no significant impact of physical exercise was found on autonomic function in control mice (Fig. 7A).

To investigate the potential benefits of physical exercise on HR and cardiac arrhythmia, we performed specific inhibitions of both autonomic branches in exercised and unexercised control and SMA-like mice at P12. After atenolol injection, the level of the HR decrease was not significantly different in exercised control and SMA-like mice when compared with sedentary counterparts (Fig. 7*B*). However, and importantly, when standardized with BW, this basic level of HR, i.e. deprived of sympathetic influence, was similar in range with the sedentary control ( $69 \pm 14$  beats min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>; Fig. 7*C*). This effect was associated with a drastic reduction in RMSSD after injection in exercised compared with unexercised SMA-like mice (P < 0.05; Fig. 7*D*), suggesting that exercise



Figure 7. Physical exercise reduces cardiac arrhythmia defects without changing autonomic balance in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice at P12

*A*, cardiac variability (root mean square of successive RR interval differences, RMSSD) decreased in exercised SMA-like mice compared with unexercised SMA-like mice, while no difference was observed in control mice (n = 15). *B*, following adrenergic receptor inhibition with atenolol, a comparable level of heart rate (HR) reduction was recorded in exercised control and SMA-like mice compared with unexercised mice. *C*, when standardized to body weight (BW), only the post-atenolol injection HR (P.I. HR) of exercised SMA-like mice reached a level comparable to controls. *D*, the exercise programme limited the RMSSD increase induced by the sympathetic inhibition in SMA-like mice. Error bars represent SD (n = 8; \*P < 0.05).

was able to reduce significantly the constitutive arrhythmia in SMA-like mice. In order to investigate the potential impact of exercise on the parasympathetic branch of the ANS, we analysed cardiac variability in exercised and unexercised SMA-like mice after inhibition of muscarinic receptors by atropine. As expected, after atropine injection, no variation in HR, standardized or not to BW, or in RMSSD was recorded in both exercised and unexercised mice (Supplementary Fig. 3).

### Physical exercise partially restores electrical conduction in SMA-like mice

We next questioned whether an exercise protocol could provide benefits on the cardiac conduction system in SMA-like mice at P12 (Fig. 8*A* and *B*). Physical exercise proved to be sufficient to significantly reduce the PR interval ( $64.5 \pm 5.5$  ms and  $46.2 \pm 2.3$  ms in unexercised and exercised SMA-like mice, respectively, P < 0.05; Fig. 8*C*) and QRS complex duration ( $15.4 \pm 5.3$  ms and  $12.5 \pm 3.1$  ms in unexercised and exercised SMA-like mice, respectively, P < 0.05; Fig. 8*D*), suggesting a partial restoration of the conduction time between the SA and AV nodes in exercised SMA-like mice. No significant differences were found in corrected QT interval between unexercised and exercised SMA-like mice ( $83.9 \pm 6.1$  ms and  $74.4 \pm 7.5$  ms, respectively; Fig. 8*E*).

### Beneficial effects of exercise on SMA-induced bradycardia and respiratory dysfunction are weight dependent

We finally determined whether an exercise protocol could provide benefits on cardiorespiratory function in SMA-like mice at P12. Four days of a moderate running-based exercise proved to be sufficient to increase significantly the absolute HR of SMA-like mice by about 37%, albeit without reaching a level comparable to controls (P < 0.05; Fig. 8F). Physical exercise provided also a significant effect on the respiratory function in SMA-like mice, with a 30% increase in HF peak from  $2.11 \pm 0.41$  Hz in unexercised to  $2.75 \pm 0.57$  Hz in exercised SMA-like mice (P < 0.05; Fig. 8G). However, the BW of exercised SMA-like mice also increased by 37% when compared with unexercised SMA-like mice (P < 0.05; Fig. 8H). Consequently, absolute HR and HF peak standardized to BW showed no significant differences after exercise, suggesting that those parameters are linked (Fig. 8*I* and *J*).

### Discussion

We provide here the first evidence that physical exercise partially restored cardiac structure and function in type 2 SMA-like mice, including cardiac conduction efficiency, potentially through the prevention of fibrosis. These exercise-induced effects led to the drastic reduction of bradycardia and arrhythmia, and to the partial recovery of HR and respiratory rate in exercised SMA-like mice.

The CNS acts as a control system for many physiological functions, including HR and HRV, breathing rate, vascular perfusion, digestion, salivation and perspiration. Although, in SMA, the CNS and motor neurons, in particular, are clearly affected by SMN deficiency and constitute the primary target for therapeutic strategies, other systems, including cardiac function, could also suffer from SMN deficiency and play a part in the pathogenesis of SMA. A series of case reports has been provided in the literature, indicating growing evidence for cardiac abnormalities in patients with SMA (Arai et al. 2005; Hachiya et al. 2005; Araujo Ade et al. 2009) and in SMA animal models (Bevan et al. 2010; Heier et al. 2010; Shababi et al. 2010). So far, very little is known about the primary causes of cardiac dysfunction in SMA, and some reports begin to suggest the implication of the ANS in the development of SMA (Bevan et al. 2010; Heier et al. 2010).

When we analysed the autonomic system function in type 2 SMA-like mice during the postnatal period, we found a progressive increase in HRV, becoming dramatically high at P12, a time point at which most of the type 2 SMA-like mice die. This progressive increase in HRV parallels a decrease in HR during the same development stages of type 2 SMA-like mice. This physiological phenomenon is classically associated with an increase in cardiac parasympathetic influence (Task Force, 1996), and pointed out as a plausible hypothesis by several reports to explain the bradycardia and arrhythmia in SMA-like mice (Bevan et al. 2010; Heier et al. 2010). However, our pharmacological analysis revealed that parasympathetic blockade failed to affect HRV and intrinsic HR in resting SMA and control mice at P12. Similar observations were reported in other wild-type mice at P6 and P12 (Sato, 2008), suggesting that the parasympathetic system is not influential at this age.

More interestingly, we found that sympathetic inhibition drastically reduced HR in both controls and type 2 SMA-like mice at P12, further emphasizing the influence of adrenergic stimulation in mice HR at this age. Surprisingly, this sympathetic inhibition also induced an increase in HRV only in type 2 SMA-like mice. Therefore, it could be hypothesized that the sympathetic activity found in type 2 SMA-like mice would likely prevent further cardiac rhythm deterioration and exacerbation of cardiac arrhythmias. So, our results support the hypothesis that the cardiac dysfunction found in SMA mice would come from a specific myocardial defect rather than a pathological sympathetic influence. Interestingly, the study from Arai and colleagues (Arai *et al.* 2005) suggested an hyperactivity of the sympathetic nervous system in



### Figure 8. Physical exercise increases cardiac conduction, heart rates (HRs) and breathing rates in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice at P12

A and *B*, representative ECGs (6 ms) of unexercised (*A*) and exercised SMA-like mice (*B*) recorded during conscious and unrestrained conditions at 30°C. *C* and *D*, physical exercise in SMA-like mice induced a significant reduction in PR interval (*C*) and QRS complex durations that reached a level comparable to controls (*D*). *E*, no modification in corrected QT interval was observed in all groups of mice (*E*; n = 15). *F*–*H*, Physical exercise increased HR (*F*), high-frequency (HF) peak (*G*) and body weight (BW) of SMA-like mice (*H*). *I* and *J*, no difference in HR (*I*) and HF peak (*J*) was detected between all groups when standardized by BW (n = 15; \**P* < 0.05). some patients with severe SMA, providing a potential explanation for some SMA-related symptoms, such as finger-cold vasodilatation and sympathetic skin response abnormalities, but not for others, in particular the defects in vascular perfusion (Araujo Ade *et al.* 2009). In the light of our work, this sympathetic overactivation observed in patients with SMA could be a consequence of a cardiomyopathy and not its cause.

Physical exercise is considered as an appropriate alternative therapy for the maintenance of cardiac stability in various cardiac pathological conditions (Billman, 2002). The influence of exercise on cardiovascular function has been investigated in adult mice, where dynamic exercise induced a resting bradycardia and an improvement in baroreflex-mediated tachycardia (De Angelis et al. 2004), similar to the exercise response observed in humans (Dixon et al. 1992; Hall, 2008). However, no study has evaluated the effects of physical exercise on the ANS of newborn mice. In the present study, unexpectedly, we showed that exercise induced a reduction in cardiac variability and increased HRs in type 2 SMA-like mice with no change in controls. Concerning the autonomic function, while no parasympathetic activity was found after exercise, an increase in cardiac sympathetic influence was recorded in SMA mice. This result would indicate that in a pathological context, the exercise induces a remarkable improvement in cardiac function but does not modify the autonomic balance.

Furthermore, the cardiac dysfunction reported in SMA-like mice could be associated with cellular architecture changes of cardiac tissue (Gardner et al. 1985). To this respect, we analysed the cardiac muscle troponin I expression and revealed a defect in the transition from skeletal to cardiac isoforms with age, suggesting a delay in cardiac maturation in type 2 SMA-like mice and a plausible cause of cardiomyopathy. Indeed, defects or mutations of cardiac muscle proteins, including cardiac troponin I or T, have been associated with cardiomyopathy in mice as well as in humans (Tsoutsman et al. 2006, 2008). Furthermore, mutation in troponin I in mouse induces an hypertrophic cardiomyopathy associated with an absence of normal exercise response, amongst others a lack of left ventricle contractility improvement (Nguyen et al. 2007). We show here that exercise promoted cardiac-isoform expression of troponin and, subsequently, an improvement in cardiac function.

Another well-described heart defect comes from the modification of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -isoforms of the cardiac MyHC expression, whose respective proportion is being controlled by developmental and hormonal factors (Everett *et al.* 1984; Allen *et al.* 2001). Indeed, in failing adult mouse hearts, a shift from the normally predominant  $\alpha$ -MyHC toward the  $\beta$ -MyHC is often observed (Harada *et al.* 1999). In the present study, we mainly observed a decrease in the expression of

 $\alpha$ -isoform, suggesting a cardiac contraction defect due to ATPase activity modifications, as demonstrated by Krenz *et al.* (2003). More interestingly, exercise induced a large increase in the expression of both isoforms, with a more pronounced effect on  $\beta$ -MyHC, whose overexpression is often correlated with a non-pathological cardiac hypertrophy (Jones *et al.* 1996), suggesting a beneficial effect of exercise on cardiac function in SMA-like mice. The evaluation of protein isoforms expression with highly specific antibodies could provide some clues for the evaluation of mRNA translation and stability modifications in SMA context and after exercise. However, several publications demonstrated a direct link between isoforms mRNA expression and cardiac function (Alpert *et al.* 2002; Krenz *et al.* 2003).

In our ECG analysis, a dramatic decrease in cardiac function was also revealed by an increase in conduction times from the SA to the Purkinje fibres of the type 2 SMA-like mice. The causes of arrhythmia and slow conduction may involve decreases in cell excitability (Cranefield *et al.* 1972), dilatation of ventricles and in contractile protein expression, including  $\alpha$ -MyHC (Berul *et al.* 1997).

The physical exercise exerts beneficial effects on cardiac conduction properties of the SMA-like mice by reducing the PR interval. However, the specific mechanisms involved are still unknown, but could implicate a combination of multiple factors, including contractile protein rearrangement, fibrosis prevention and calcium-activated signalling known to modulate cardiomyocytes excitability (Chai *et al.* 2011).

Among the many pathological systems involved in SMA, a crucial one concerns the control of the respiratory function, including ventilatory parameters that are associated with a reduction of vital capacities (Samaha et al. 1994; Bach et al. 2012). Surprisingly, a limited number of studies have investigated the respiratory rate in human or mouse models. Here, we provide the first lines of evidence for a dramatic reduction in respiratory rates in severe SMA-like mice. Interestingly, significant alterations in respiratory rates were not observed in another SMA mouse model of comparable severity, from P0 to P8 (El-Khodor *et al.* 2008), an apparent controversy that might be resolved considering the age of respiratory symptoms appearance (P6-P12). In a more severe SMA mouse model, smaller ventilation levels with frequent and longer apnoeas were found at 7 days old, while the breathing pattern was normal at P1 (Michaud et al. 2010). Thus, the progressive deterioration of breathing patterns from P6 to P12 we observed in the type 2 SMA-like mice should certainly proceed from the respiratory muscles denervation phenomenon occurring at these ages (Kariya et al. 2008; McGovern et al. 2008). Interestingly, no breathing rate changes occurred when related to body size, indicating an overall cardiorespiratory adaptation

during growth in mice. It is important to note that during the postnatal development period, HR to BW ratios did not change during growth, in control as well as in SMA mice, suggesting a cardiorespiratory adaptation during this normally rapid development period in neonates. These cardiorespiratory adaptations were also found on SMA-like mouse models with equivalent lifespan (Heier *et al.* 2010).

Most importantly, the present study provides the first lines of evidence for the partial restoration of ventilatory patterns with physical exercise in an SMA context. The increase in breathing rates we observed in SMA-like mice invites speculation about an exercise-induced ventilatory muscles maturation, as already reported in our laboratory with an exercise-induced acceleration of motor neuron maturation and improvement of the neuromuscular junction morphology in the hind limb muscles of SMA-like mice (Biondi *et al.* 2008).

Taken together, the present study provides evidence that the cardiomyopathy observed in SMA model mice is mainly due to intrinsic cardiac alteration but not autonomic impairment. More importantly, we found that physical exercise partially restores cardiac function in a severe type of SMA mice. This study and others are beginning to indicate a more profound involvement of cellular, structural and vascular cardiac dysfunction in the pathogenesis of SMA, widely opening alternative pharmacological and non-pharmacological therapeutic strategies that would most certainly include physical exercise.

### References

- Adamcova M & Pelouch V (1999). Isoforms of troponin in normal and diseased myocardium. *Physiol Res* **48**, 235–247.
- Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC & Leinwand LA (2001). Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. J Appl Physiol 90, 1900–1908.
- Alpert NR, Brosseau C, Federico A, Krenz M, Robbins J & Warshaw DM (2002). Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H1446–H1454.

Arai H, Tanabe Y, Hachiya Y, Otsuka E, Kumada S, Furushima W, Kohyama J, Yamashita S, Takanashi J & Kohno Y (2005). Finger cold-induced vasodilatation, sympathetic skin response, and R-R interval variation in patients with progressive spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* **20**, 871–875.

Araujo Ade Q, Araujo M & Swoboda KJ (2009). Vascular perfusion abnormalities in infants with spinal muscular atrophy. *J Pediatr* 155, 292–294.

- Bach JR (2007). Medical considerations of long-term survival of Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Phys Med Rehabil* **86**, 349–355.
- Bach JR (2012). Noninvasive respiratory management of high level spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* **35**, 72–80.

- Baudrie V, Laude D & Elghozi JL (2007). Optimal frequency ranges for extracting information on cardiovascular autonomic control from the blood pressure and pulse interval spectrograms in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R904–R912.
- Bernardi L, Porta C, Gabutti A, Spicuzza L & Sleight P (2001). Modulatory effects of respiration. *Auton Neurosci* 90, 47–56.
- Berul CI, Christe ME, Aronovitz MJ, Seidman CE, Seidman JG & Mendelsohn ME (1997). Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in alpha MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. *J Clin Invest* **99**, 570–576.
- Bevan AK, Hutchinson KR, Foust KD, Braun L, McGovern VL, Schmelzer L, Ward JG, Petruska JC, Lucchesi PA, Burghes AH & Kaspar BK (2010). Early heart failure in the SMNDelta7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. *Hum Mol Genet* **19**, 3895–3905.
- Billman GE (2002). Aerobic exercise conditioning: a nonpharmacological antiarrhythmic intervention. J Appl Physiol 92, 446–454.
- Biondi O, Grondard C, Lecolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C & Charbonnier F (2008). Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* **28**, 953–962.
- Chai Y, Zhang DM & Lin YF (2011). Activation of cGMP-dependent protein kinase stimulates cardiac ATP-sensitive potassium channels via a ROS/calmodulin/CaMKII signaling cascade. *PLoS One* 6, e18191.
- Cranefield PF, Wit AL & Hoffman BF (1972). Conduction of the cardiac impulse. 3. Characteristics of very slow conduction. *J Gen Physiol* **59**, 227–246.
- De Angelis K, Wichi RB, Jesus WR, Moreira ED, Morris M, Krieger EM & Irigoyen MC (2004). Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol* **96**, 2174–2178.
- De Meersman RE (1993). Heart rate variability and aerobic fitness. *Am Heart J* **125**, 726–731.
- Dixon EM, Kamath MV, McCartney N & Fallen EL (1992). Neural regulation of heart rate variability in endurance athletes and sedentary controls. *Cardiovasc Res* **26**, 713–719.
- Drummond GB (2009). Reporting ethical matters in the Journal of Physiology: standards and advice. *J Physiol* **587**, 713–719.
- Eckberg DL (1997). Baroreflexes and the failing human heart. *Circulation* **96**, 4133–4137.
- El-Khodor BF, Edgar N, Chen A, Winberg ML, Joyce C, Brunner D, Suarez-Farinas M & Heyes MP (2008). Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMNDelta7 neonate model of spinal muscular atrophy. *Exp Neurol* **212**, 29–43.
- Everett AW, Sinha AM, Umeda PK, Jakovcic S, Rabinowitz M & Zak R (1984). Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in the alpha- and beta-myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart. *Biochemistry* **23**, 1596–1599.

Gardner PI, Ursell PC, Fenoglio JJ, Jr & Wit AL (1985). Electrophysiologic and anatomic basis for fractionated electrograms recorded from healed myocardial infarcts. *Circulation* **72**, 596–611.

Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lecolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C & Charbonnier F (2005). Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 25, 7615–7622.

Hachiya Y, Arai H, Hayashi M, Kumada S, Furushima W, Ohtsuka E, Ito Y, Uchiyama A & Kurata K (2005). Autonomic dysfunction in cases of spinal muscular atrophy type 1 with long survival. *Brain Dev* **27**, 574–578.

Hall GH (2008). Exercise ECGs in angina. Which "angiographic positives" will die from heart disease? *BMJ* **337**, a3100.

Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y & Komuro I (1999). Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation* **100**, 2093–2099.

Hayano J & Yasuma F (2003). Hypothesis: respiratory sinus arrhythmia is an intrinsic resting function of cardiopulmonary system. *Cardiovasc Res* **58**, 1–9.

Heier CR, Satta R, Lutz C & DiDonato CJ (2010). Arrhythmia and cardiac defects are a feature of spinal muscular atrophy model mice. *Hum Mol Genet* **19**, 3906–3918.

Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH & Li H (2000). A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* **24**, 66–70.

Jones WK, Grupp IL, Doetschman T, Grupp G, Osinska H, Hewett TE, Boivin G, Gulick J, Ng WA & Robbins J (1996). Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart. *J Clin Invest* **98**, 1906–1917.

Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT & Monani UR (2008). Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*.

Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marce M, Griffin JW, Rich MM & Sumner CJ (2009). Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 29, 842–851.

Kostova FV, Williams VC, Heemskerk J, Iannaccone S, Didonato C, Swoboda K & Maria BL (2007). Spinal muscular atrophy: classification, diagnosis, management, pathogenesis, and future research directions. *J Child Neurol* 22, 926–945.

Krenz M, Sanbe A, Bouyer-Dalloz F, Gulick J, Klevitsky R, Hewett TE, Osinska HE, Lorenz JN, Brosseau C, Federico A, Alpert NR, Warshaw DM, Perryman MB, Helmke SM & Robbins J (2003). Analysis of myosin heavy chain functionality in the heart. *J Biol Chem* 278, 17,466–17,474.

Lompre AM, Nadal-Ginard B & Mahdavi V (1984). Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem* **259**, 6437–6446.

- Martinez-Hernandez R, Soler-Botija C, Also E, Alias L, Caselles L, Gich I, Bernal S & Tizzano EF (2009). The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 474–481.
- McGovern VL, Gavrilina TO, Beattie CE & Burghes AH (2008). Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum Mol Genet*.

Michaud M, Arnoux T, Bielli S, Durand E, Rotrou Y, Jablonka S, Robert F, Giraudon-Paoli M, Riessland M, Mattei MG, Andriambeloson E, Wirth B, Sendtner M, Gallego J, Pruss RM & Bordet T (2010). Neuromuscular defects and breathing disorders in a new mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* **38**, 125–135.

- Mitchell GF, Jeron A & Koren G (1998). Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **274**, H747–H751.
- Nguyen L, Chung J, Lam L, Tsoutsman T & Semsarian C (2007). Abnormal cardiac response to exercise in a murine model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* **119**, 245–248.

Niskanen JP, Tarvainen MP, Ranta-Aho PO & Karjalainen PA (2004). Software for advanced HRV analysis. *Comput Methods Programs Biomed* **76**, 73–81.

- Oskoui M & Kaufmann P (2008). Spinal muscular atrophy. *Neurotherapeutics* **5**, 499–506.
- Samaha FJ, Buncher CR, Russman BS, White ML, Iannaccone ST, Barker L, Burhans K, Smith C, Perkins B & Zimmerman L (1994). Pulmonary function in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* **9**, 326–329.

Sato S (2008). Quantitative evaluation of ontogenetic change in heart rate and its autonomic regulation in newborn mice with the use of a noninvasive piezoelectric sensor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H1708–H1715.

Shababi M, Habibi J, Yang HT, Vale SM, Sewell WA & Lorson CL (2010). Cardiac defects contribute to the pathology of spinal muscular atrophy models. *Hum Mol Genet* 19, 4059–4071.

Smith ML, Hudson DL, Graitzer HM & Raven PB (1989). Exercise training bradycardia: the role of autonomic balance. *Med Sci Sports Exerc* 21, 40–44.

Stoica P & Moses RL (1997). Introduction to Spectral Analysis. Prentice Hall, New Jersey, ISBN: 0-13-258419-0.

Sveen ML, Jeppesen TD, Hauerslev S, Kober L, Krag TO & Vissing J (2008). Endurance training improves fitness and strength in patients with Becker muscular dystrophy. *Brain* 131, 2824–2831.

Swoap SJ, Li C, Wess J, Parsons AD, Williams TD & Overton JM (2008). Vagal tone dominates autonomic control of mouse heart rate at thermoneutrality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H1581–H1588.

Task Force (1996). Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use.Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J* 17, 354–381.

Thireau J, Zhang BL, Poisson D & Babuty D (2008). Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp Physiol* **93**, 83–94.

5924

- Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG & Rosenfelder G (1984). Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J Immunol Methods* **72**, 471–479.
- Tsoutsman T, Bagnall RD & Semsarian C (2008). Impact of multiple gene mutations in determining the severity of cardiomyopathy and heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**, 1349–1357.
- Tsoutsman T, Chung J, Doolan A, Nguyen L, Williams IA, Tu E, Lam L, Bailey CG, Rasko JE, Allen DG & Semsarian C (2006). Molecular insights from a novel cardiac troponin I mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 41, 623–632.
- Yotsukura M, Fujii K, Katayama A, Tomono Y, Ando H, Sakata K, Ishihara T & Ishikawa K (1998). Nine-year follow-up study of heart rate variability in patients with Duchenne-type progressive muscular dystrophy. *Am Heart J* **136**, 289–296.

#### **Author contributions**

O.B. and P.L. conducted, designed and analysed the majority of the experiments, and partly wrote the manuscript. C.D. and

J.B. conducted the Western blot experiments. F.C. and A.B.S. helped with the exercise programme and in the analysis of cardiac muscle data. C.D., C.C. and C.P. assisted in the majority of experiments, and C.P. helped in writing the manuscript. F.C. supervised the project and partly wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript for publication.

#### Acknowledgements

All the authors wish to thank Hung Li for his fruitful collaboration over the past years. We thank S. Besse, C.-L. Gallien, D. Laude and V. Baudrie for their comments and advice. J.B. is the recipient of a fellowship from the Ministere de la Recherche et de la Technologie. F.C. is the recipient of a fellowship from AXA Research and Garches Fundation. This work was supported by a grant from the AFM (Association Française contre les Myopathies). The authors have no conflict of interest to declare.




Neurobiology of Disease

# IGF-1R Reduction Triggers Neuroprotective Signaling Pathways in Spinal Muscular Atrophy Mice

Olivier Biondi,<sup>1\*</sup> Julien Branchu,<sup>1\*</sup> Amina Ben Salah,<sup>1</sup> Léo Houdebine,<sup>1</sup> Lise Bertin,<sup>1</sup> Farah Chali,<sup>1</sup> Céline Desseille,<sup>1</sup> Laure Weill,<sup>1</sup> ©Gabriel Sanchez,<sup>2</sup> Camille Lancelin,<sup>1</sup> Saba Aïd,<sup>3</sup> Philippe Lopes,<sup>1,4</sup> Claude Pariset,<sup>1</sup> Sylvie Lécolle,<sup>1</sup> Jocelyn Côté,<sup>2</sup> ©Martin Holzenberger,<sup>3</sup> Christophe Chanoine,<sup>1</sup> Charbel Massaad,<sup>1</sup> and Frédéric Charbonnier<sup>1</sup> <sup>1</sup>Université Paris Descartes and INSERM Unité Mixte de Recherche Scientifique 1124, F-75270 Paris Cedex 06, France, <sup>2</sup>Centre for Neuromuscular Disease and Department of Cellular and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada K1H 8M5, and <sup>3</sup>INSERM and Sorbonne Universities, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, and <sup>4</sup>Université d'Evry-val-d'Essonne, Evry 91025, France

Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disease characterized by the selective loss of spinal motor neurons due to the depletion of the survival of motor neuron (SMN) protein. No therapy is currently available for SMA, which represents the leading genetic cause of death in childhood. In the present study, we report that insulin-like growth factor-1 receptor (*Igf-1r*) gene expression is enhanced in the spinal cords of SMA-like mice. The reduction of expression, either at the physiological (through physical exercise) or genetic level, resulted in the following: (1) a significant improvement in lifespan and motor behavior, (2) a significant motor neuron protection, and (3) an increase in SMN expression in spinal cord and skeletal muscles through both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. Furthermore, we have found that reducing IGF-1R expression is sufficient to restore intracellular signaling pathway activation profile lying downstream of IGF-1R, resulting in both the powerful activation of the neuroprotective AKT/CREB pathway and the inhibition of the ERK and JAK pathways. Therefore, reducing rather than enhancing the IGF-1 pathway could constitute a useful strategy to limit neurodegeneration in SMA.

Key words: gene expression; IGF-1R; model mice; signaling pathways; SMN; spinal muscular atrophy

## Significance Statement

Recent evidence of IGF-1 axis alteration in spinal muscular atrophy (SMA), a very severe neurodegenerative disease affecting specifically the motor neurons, have triggered a renewed interest in insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway activation as a potential therapeutic approach for motor neuron diseases. The present study challenges this point of view and brings the alternative hypothesis that reducing rather than enhancing the IGF-1 signaling pathway exerts a neuroprotective effect in SMA. Furthermore, the present data substantiate a newly emerging concept that the modulation of IGF-1 receptor expression is a key event selectively determining the activation level of intracellular pathways that lie downstream of the receptor. This aspect should be considered when designing IGF-1-based treatments for neurodegenerative diseases.

#### Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal-recessive disease occurring in early childhood for which no specific therapy

Received Feb. 13, 2015; revised July 13, 2015; accepted July 27, 2015.

The authors declare no competing financial interests.

\*0.B. and J.B. contributed equally to this work.

exists. SMA is characterized by the specific loss of spinal motor neurons, leading to a progressive muscular weakness and subsequent death when vital muscles are affected (Crawford and Pardo, 1996). SMA is caused by mutation of the *Survival of Motor Neuron 1* (*SMN1*) gene (Lefebvre et al., 1995), leading to a defective SMN protein expression. The disease severity is modulated by the expression of *SMN2*, a *SMN1* gene copy. *SMN2* produces only a small amount of full-length *SMN* transcripts due to the alternative splicing of exon 7, leading to a small amount of stable SMN protein (Lorson and Androphy, 2000). Despite two decades

Author contributions: F. Charbonnier designed research; O.B., J.B., A.B.S., L.H., L.B., F. Chali, C.D., L.W., G.S., C.L., and S.A. performed research; O.B., J.B., L.W., P.L., S.L., J.C., M.H., C.C., C.M., and F. Charbonnier analyzed data; C.P. and F. Charbonnier wrote the paper.

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies. J.B. is the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. J.C. is a Canada Research Chair (Tier 2) in RNA Metabolism funded through an operating grant from the Canadian Institutes for Health Research (Grant MOP-86746). G.S. is the recipient of a postdoctoral fellowship from Association Française contre les Myopathies. We thank S. Lefebvre for antibodies against SMN, K. Mamchaoui and V. Mouly (Human Cell Culture Platform of the Myology Institute, Paris, France) for providing the human cells from SMA patients, and C. Mader for animal care.

Correspondence should be addressed to Frédéric Charbonnier, Université Paris Descartes and INSERM UMR\_S 1124, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France. E-mail: frederic.charbonnier@parisdescartes.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0608-15.2015

Copyright © 2015 the authors 0270-6474/15/3512063-17\$15.00/0

of research, the specific sensitivity of motor neurons to defects of the ubiquitous SMN protein that is involved in essential cell processes such as mRNA metabolism (Fischer et al., 1997; Pellizzoni et al., 1998) remains poorly understood. Microarray analyses unexpectedly failed to identify the specific misexpression of some essential genes in motor neurons after SMN depletion (Zhang et al., 2008). This may suggest that the selective degeneration of motor neurons in SMA results from alterations of systemic pathways that would ultimately target motor neurons.

Although multiple neurotrophic factors are implicated in neuron survival, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is a critical factor for the maintenance and the survival of motor neurons (Neff et al., 1993; Ozdinler and Macklis, 2006). Interestingly, several recent investigations pointed toward an IGF-1 signaling pattern-alteration in SMA. First, the levels of circulating IGF-1 and Igf-1 hepatic mRNA expression were shown to display a marked reduction in a severe type of SMA-like model mice (Hua et al., 2011; Murdocca et al., 2012). Second, in skeletal muscles from type 1 SMA patients (Millino et al., 2009) or from SMA mice (Bosch-Marcé et al., 2011), the IGF-1 receptor (IGF-1R) was found to be overexpressed. The level of this overexpression in human biopsies correlated with the severity of the disease (Millino et al., 2009). Interestingly, increasing IGF-1 availability for mouse SMA mouse muscles had no effect on IGF-1R expression (Bosch-Marcé et al., 2011), suggesting that IGF-1R overexpression was constitutive and not the result of a compensatory mechanism for a putative decrease in serum IGF-1 concentration. Unfortunately, data on the IGF-1R expression in SMA mouse CNS are presently lacking. Third, among the three intracellular signaling pathways known to lie downstream of IGF-1R, the ERK1/2, JAK/STAT3, and AKT pathways (D'Mello et al., 1997; Párrizas et al., 1997; Yadav et al., 2005), the ERK cascade was found to be constitutively overactivated in the spinal cord and muscles (Millino et al., 2009; Biondi et al., 2010). In contrast, the AKT pathway was found to be underactivated in SMA mouse spinal cords (Biondi et al., 2010; Kye et al., 2014).

Interestingly, IGF-1R overexpression was reported in the CNS and muscles from patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Wilczak et al., 2003; Lunetta et al., 2012), another fatal motor neuron disease, contrasting with nearly identical serum IGF-1 concentration (Corbo et al., 2010). Moreover, recent data demonstrated that the reduction of IGF-1 signaling through *Igf-1r* gene partial inactivation (*Igf-1r*<sup>+/-</sup>) resulted in an increase in lifespan; a greater resistance to oxidative stress (Holzenberger et al., 2003); and a reduction in behavioral impairment, neuroinflammation, and neuronal and synaptic loss in a mouse model of Alzheimer's disease (Cohen et al., 2009). Therefore, one could ask whether enhancing or depressing IGF-1 related signaling pathway results in a beneficial or detrimental effect on SMA motor neurons. To address this question directly, we generated an SMA mouse model harboring only one functional allele for Igf-1r (Igf- $1r^{+/-}$ ) and analyzed the hallmarks of SMA pathogenesis.

## Materials and Methods

*Mice and treatments.* The knock-out transgenic type 2 SMA-like mice (FVB/NRj-*Smn*<sup> $\Delta 7/\Delta 7$ </sup> *SMN2*) derived from mice obtained from the Institute of Molecular Biology (Hsieh-Li et al., 2000; Academia Sinica). To standardize the type 2 phenotype, male and female mutant mice with a weight ranging from 3 to 4 g at 8 d of age were used for this study, as described previously (Biondi et al., 2008). We generated a new mouse strain by crossing FVB/NRj-*Smn*<sup> $+/\Delta 7</sup>$  *SMN2* mice with *Igf1r*<sup>+/-</sup> mice (B6.129-*Igf1r*tm1.2Mhz/Orl, strain EM00115 from the EMMA mouse repository; (Holzenberger et al., 2003). After the crossing between FVB/NRj-*Smn*<sup> $+/\Delta 7</sup>$ *SMN2*and B6.129-*Igf1r*tm1.2Mhz/Orl strains, the double</sup></sup>

mutant carriers were backcrossed for 10 generations to the FVB/NRj strain (Janvier Labs) to purify the genetic background of the mice. Among the different genotypes generated in offspring, the original parental genotypes ( $Smn^{\Delta 7/+} SMN2 Igf-1r^{+/+}$ ; n = 74) mice and ( $Smn^{\Delta 7/+} SMN2 Igf-1r^{+/-}$ ; n = 65) mice were referred to as "control" and " $Igf-1r^{+/-}$  control," respectively, and the SMA-like mice ( $Smn^{\Delta 7/\Delta 7} SMN2 Igf-1r^{+/+}$ ; n = 62) and  $Smn^{\Delta 7/\Delta 7} SMN2 Igf-1r^{+/-}$  (n = 61) mice were designated as "SMA" and " $Igf-1r^{+/-} SMA$ ," respectively. Male and female were used for this study. Body weight and lifespan recording were performed daily until animal death. The animals were considered to be dead when they were no longer able to stand up after having been placed on their sides for 1 min. The care and treatment of animals followed the national authority (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France) guidelines for the detention, use, and ethical treatment of laboratory animals.

*Training protocol.* Exercise was performed in a wheel with a controlled speed as described previously (Grondard et al., 2005). The protocol was started from 8 d of age (postnatal day 8, P8). The mice in the trained group were progressively accustomed to wheel training for 2 d (the first day, 4 periods of 5 min running with a rest period of 30 min; the second day, 2 periods of 10 min running with a rest period of 30 min). Next, mice were individually and continuously trained for 20 min/d. The speed was fixed at 1 m/min for the first 3 d and then increased by successive steps of 2 m/min, finally reaching 5 m/min (maximal speed).

Behavioral evaluation. The grip strength was performed in the forelimb of Igf- $1r^{+/+}$  and Igf- $1r^{+/-}$  control mice and Igf- $1r^{+/+}$  and Igf- $1r^{+/-}$ type 2 SMA-like mice from P8 to death. The time spent holding onto a thin metal rod suspended in midair was calculated. Each mouse was subjected to five successive attempts separated by a 10 min rest period.

The ambulatory behavior was assessed in an open-field test for all groups. The apparatus consisted of a wooden box measuring  $28 \times 28 \times 15$  cm. The floor of the arena was divided into  $16.7 \times 7$  cm squares. The mice were tested individually and the open field was washed after each session. Each mouse initially placed in the center of the open field was allowed to move freely for 5 min. The behavioral measures recorded manually during these 5 min were the number of peripheral and central square crossings.

*IGF-1 ELISA*. Mice were anesthetized with 1% pentobarbital solution (6  $\mu$ l/g) diluted in 0.9% saline buffer by intraperitoneal injection. A 400  $\mu$ l blood sample was taken from the right ventricle with a 1 ml syringe mounted with a 22 gauge needle, both coated with heparin (5000 UI/ml; Pan Pharma Luitré). The blood sample was centrifuged at 1500 × g for 10 min at +4°C. The serum was frozen, stored at  $-80^{\circ}$ C, and used within 1 month. The quantity of IGF-1 was determined on 100  $\mu$ l of serum in duplicate using the Murine IGF-1 ELISA kit (900-K170; Peprotech) and following the manufacturer's instructions.

In situ hybridization. To detect Igf-1r mRNAs, antisense oligonucleotide probes were synthesized as described previously (Oshima et al., 2002; Fukaya et al., 2005): forward 5'-CACAGTCATCCGTGGCTGGA-3' and reverse 5'-CGCTTCCCACACACACTTGG-3'. Under deep pentobarbital (40 mg/kg) anesthesia, spinal cords were obtained from P12 SMA-like mice. Frozen sections (14  $\mu$ m thickness) were mounted on glass slides coated with 3-aminopropyltriethoxysilane. Each section was fixed immediately after cutting by immersion for 20 min in 2% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Sections were then rinsed three times in PBS, dipped in water, and dehydrated with a graded ethanol series (70%, 95%, and 100%). The sections were then air-dried and stored at -80°C until further use. The hybridization mixture contained 50% formamide, 4× standard saline citrate (SSC), 1× Denhardt's solution, 0.25 mg/ml yeast tRNA, 0.25 mg/ml sheared salmon sperm, 0.25 mg/ml polyA, 10% dextran sulfate, 100 mM DTT, and [35S]-dATPlabeled oligonucleotide probes  $(4.5 \times 10^{6} \text{ dpm/ml})$ . One hundred microliters of hybridization mixture was placed on each section. The sections were then covered with a Parafilm coverslip and incubated in a humidified chamber at +43°C for 20 h. After hybridization, the sections were washed successively twice in  $1 \times$  SSC containing 0.01 M DTT and twice in  $0.5 \times$  SSC containing 0.01 M DTT for 15 min at +55°C and finally in  $0.5 \times$  SSC containing 0.1 M DTT for 15 min at room temperature.



Sections were exposed to Nuclear Track emulsion (NTB-2; Kodak) for 8 weeks.

Histological and immunohistochemical analysis. For motor neuron studies, anesthetized animals were submitted to an intracardial perfusion of 40 ml of PBS solution at 1.2 ml/min followed by 40 ml of 4% PFA solution diluted in PBS solution at the same flow. Then, spinal cords were dissected, incubated overnight in 4% PFA solution, and washed twice for 2 h with PBS. The lumbar spinal cords (L1 to L5) were cut using a vibratome VT-1000S (Leica) on the whole length of the sample at 50- $\mu$ m-thick cross sections. One of every five sections was processed for immunohistochemical analysis as described previously (Branchu et al., 2013).

For SMN immunostaining, spinal cords were dissected from anesthetized animals and immediately frozen in cold isopentane solution  $(-80^{\circ}C)$ . The lumbar spinal cords (L1 to L5) were cut selectively using a cryostat microtome (CM3050S; Leica) at 14- $\mu$ m-thick cross sections. One of every 10 sections (40 sections examined) was processed for immunohistochemical analysis as described previously (Grondard et al., 2005).

All types of sections were then incubated for 1 h at room temperature in a blocking solution (7% normal donkey serum with 1% Triton X-100 and 0.5% Tween 20 in TBS). Incubations in corresponding primary antisera, namely polyclonal goat anti-choline acetyltransferase (ChAT; 1:400; Millipore) and polyclonal rabbit anti-SMN clone 502 (1:400; obtained from Suzie Lefebvre, Paris, France) primary antibodies, were then performed for 3 d at  $+4^{\circ}$ C in the blocking solution. Sections were washed in TBS buffer with 0.5% Tween 20 and subsequently incubated with polyclonal Cy3-conjugated donkey anti-goat (1:400; Jackson ImmunoResearch) and/or polyclonal Alexa Fluor 488-conjugated donkey antirabbit (1:400; Jackson ImmunoResearch) antibodies for 1 h at room temperature in the blocking solution. The sections were washed in TBS and mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories). The staining specificity was checked incubating sections in absence of the primary antibody.

For motor end-plate labeling, whole-mount preparations of muscle fibers were stained using Alexa Fluor 568-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (4 mg/ml in PBS with 4% bovine serum albumin), monoclonal rabbit antineurofilament light protein (NN18, 1:500; Millipore), and synaptophysin (1:5; Invitrogen Life Technologies). The whole-mount preparations were subsequently incubated with an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:400; Invitrogen) for 1 h at room temperature as described previously (Branchu et al., 2013). The different developmental synapse shapes were determined according to Sanes and Lichtman (1999) and visualized using  $\alpha$ -bungarotoxin staining for innervated neuromuscular junctions (NMJs). The acetylcholine receptor (AChR) clusters appearing elliptical

←

Figure 1. The IGF-1 axis is altered in the spinal cords of severe SMA-like mice. A, In situ hybridization on lqf-1r mRNA for the localization of expression in the lumbar spinal cords (L1-L5) of untrained control and type 2 SMA-like mice (left) compared with trained control and type 2 SMA-like mice (right) at 12 d of age (n = 4). Scale bar, 100  $\mu$ m. **B**, Quantification by real-time qRT-PCR of lgf-1r transcripts normalized by 18S transcripts in the ventral lumbar spinal cords of untrained control and type 2 SMA-like mice compared with trained control and type 2 SMA-like mice at 12 d of age (n = 10). **C**–**E**, Western blot analysis (**C**) and quantification of IGF-1R $\beta$  (**D**) and SMN (E) protein expression in the ventral lumbar spinal cords of untrained control and type 2 SMA-like mice compared with trained control and type 2 SMA-like mice at 12 d of age (n = 4). F, Quantification of circulating IGF-1 concentration by ELISA in the serum of untrained control and type 2 SMA-like mice compared with trained control and type 2 SMA-like mice at 12 d of age (n = 4). **G**, Schematic representation of the crossings yielding to *lgf-1r<sup>+/-</sup>* SMA mice. **H**, Quantification by real time qRT-PCR of lqf-1r transcripts normalized by 18S transcripts in the ventral lumbar spinal cords of  $lgf-1r^{+/+}$  and  $lgf-1r^{+/-}$  control mice compared with  $lgf-1r^{+/-}$  $1r^{+/+}$  and  $lqf-1r^{+/-}$  SMA mice at 12 d of age (n = 10). I, J, Western blot analysis (I) and quantification (J) of IGF-1R $\beta$  protein expression in the ventral lumbar spinal cords of *lgf-1r* +/+ and  $lqf-1r^{+/-}$  control mice compared with  $lqf-1r^{+/+}$  and  $lqf-1r^{+/-}$  SMA mice at 12 d of age (n = 5). K, Quantification of circulating IGF-1 concentration by ELISA in the serum of IGF- $1R^{+/+}$  and IGF-1R^{+/-} control mice compared with Igf-1r^{+/+} and Igf-1r^{+/-} SMA mice at 12 d of age (n = 4). Data are represented as mean  $\pm$  SEM and significance is reported versus untrained or *lgf-1r*  $^{+/+}$  control mice, respectively (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

and uniform or with some low AChR density but without perforation were defined as "uniform-plaques." Elliptical AChR clusters displaying at least one perforation but maintaining a peripheral continuity were defined as "perforated-plaques." Finally, AChR cluster displaying an important number of perforations and a loss of peripheral continuity were defined as "pretzel-like plaques," the only shape for which we could observe a more precise spatial correspondence between nerve terminals and AChR clusters. The proportions of each type of plaque were determined from a minimum of 100 NMJs per muscle and per mouse and expressed as percentage of total counted NMJs.

For muscle typology, cryostat sections (one transversal medial section per muscle and per animal, which represented ~4000, 6000, and 12,000 muscle fibers in the soleus, the plantaris, and the tibialis, respectively, for each experimental point) were either stained or processed for immunochemistry. For the staining protocol, muscles sections were dried for 30 min at room temperature and then stained with an H&E classical protocol. For the immunochemistry protocol, muscles sections were fixed with acetone for 20 min at room temperature and washed three times in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBST). Slices were then incubated with mouse monoclonal antibodies raised against myosin heavy chains (My-HCs): (1) embryonic (F1.652; University of Iowa, Iowa City, IA), (2) neonatal (N3.36; University of Iowa), (3) slow type I (NCL-MyHCs), (4) all fast type II (NCL-MyHCf; Leica), and (5) intermediate type IIa MyHC isoforms (A4.74) at a dilution of 1:20 for 1 h at room temperature and washed three times in PBST. Sections were then incubated at room temperature with a rabbit anti-mouse Ig conjugated with FITC (1:20; Sigma-Aldrich) for 1 h. After washing with PBS, sections were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). The percentage of fast IIx/b fibers were determined as the difference between the total number of type II and type IIa fibers.

All counts were performed using ImageJ software version 1.46. Color images were tinted, also using ImageJ, and identical brightness, contrast, and color balance adjustments were applied to all groups.

*Microscopy.* All immunofluorescence images were collected with a CMOS camera (ORCA Flash 2.8; Hamamatsu Photonics) mounted on a Zeiss Z1 AxioObserver using ZEN 2012 software with  $100 \times [10 \times$  Zeiss Plan NeoFluar numerical aperture (NA) 0.3],  $200 \times (20 \times Zeiss$  EC-Plan-Apo NA 0.8), and  $630 \times (63 \times Zeiss$  Plan-Apo Oil NA 1.4) magnifications.

Silencing of IGF-1R with siRNA in cell cultures. MN-1 (Motoneuron-1) cells have been derived from the spinal cords of E18 control mice and immortalized (Salazar-Grueso et al., 1991). These cells only harbor the two alleles of the murine *Smn* genes. MN-1 cells have been provided by J. Côté (Ottawa University, Canada) and were plated at 5000 cells/cm<sup>2</sup> at  $+37^{\circ}$ C in 5% CO<sub>2</sub> in a 6 well plate with DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 1% of penicillin/streptomycin (P/S) growth medium (GM).

Human primary culture of myogenic precursor cells was derived from SMA patient biopsies. Muscle biopsies were obtained from the Bank of Tissues for Research (a partner in the European Union network Euro-BioBank) in accordance with European recommendations and French legislation. Satellite cells were isolated from biopsies and grown as described previously (Bigot et al., 2009). The myogenic purity of the population was monitored by immunocytochemistry using desmin as a marker. Myoblast cells were plated at 10,000 cells/cm<sup>2</sup> in 6 well plates at  $+37^{\circ}$ C in 5% CO<sub>2</sub> in DMEM Glutamax (Invitrogen) supplemented with 20% FBS (Invitrogen), 1% Ultroser G (Pall), and 1% P/S (5000 U; Invitrogen) for 2 d. Then, differentiation was induced with DMEM supplemented with 5% horse serum (Invitrogen) and 1% P/S (5000 U; Invitrogen) differentiation medium (DM) for 10 d.

MN-1 cells at 50% confluence were transfected with Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen) in antibiotic-free GM with either ON-TARGETPlus nontargeting siRNA (D-001810–01; GE Healthcare) as a negative control or ON-TARGETPlus mouse *Igf-1r* siRNA (L-056843; GE Healthcare) at 50 nM, following the manufacturer's instructions. Human myotubes were transfected with Dharmafect 3 transfection reagent (GE Healthcare) in antibiotic-free DM with either the same non-targeting siRNA or with ON-TARGETPlus human *IGF-1R* siRNA (L-03012; GE Healthcare) at 50 nM following the manufacturer's



**Figure 2.** Genetic reduction of IGF-1R expression extends survival and motor behavior and promotes neuroprotection in SMA mice. **A**, Phenotype of Igf- $1r^{+/-}$  control mice compared with SMA mice and Igf- $1r^{+/-}$  SMA mice at 12 d of age. Scale bar, 1 cm. **B**, Lifespan of Igf- $1r^{+/+}$  compared with Igf- $1r^{+/-}$  control and SMA mice (n = 40). (Figure legend continues.)

instructions. Transfection medium was replaced by GM or DM after 16 h. Cells were harvested 56 h later in cold  $1 \times$  PBS (Invitrogen) and centrifuged at  $200 \times g$  for 3 min. Then, supernatants were removed and pellets frozen at  $-80^{\circ}$ C.

Protein and Western blot analysis. The ventral part of frozen spinal cords was selectively dissected by razor blade at  $-20^{\circ}$ C. A furrow appears in the middle of the ventral part and dorsal root ganglia and can be seen on the dorsal part of the spinal cord. Frozen pellets of MN-1 and human primary culture myotubes were homogenized in 50  $\mu$ l of ice-cold RIPA buffer [50 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP40, 5 mM EDTA, pH 8.0, 2 mM PMSF (Sigma-Aldrich), 50 µg/ml leupeptin, 50 µg/ml pepstatin A, and 50 µg/ml aprotinin] for 2 wells of a 6 well plate; ventral lumbar spinal cord samples were homogenized in 100 µl of ice-cold RIPA buffer for 5 mg of tissue. Protein concentration of the clarified homogenates (+4°C, 15 min, 13,500 revolutions/min) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Bio-Rad). Then, 10  $\mu g$  protein samples for SMN analysis and 30  $\mu$ g samples for other analysis of each homogenate were submitted to 12.5% SDS-PAGE electrophoresis (1.5 M Tris, pH 8.3, 12.5% acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.06% TEMED). The separated proteins were transferred on PVDF membranes (Bio-Rad; Towbin et al., 1984). Equal loading of samples was checked by Ponceau dye staining of the transferred gels. Western blot analysis was performed on membranes incubated overnight at +4°C in 4% BSA, 0.1% Tween 20, and TBS, pH 7.4. Each of the following primary antibodies, including monoclonal mouse anti-SMN (1:5000; Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit anti-Ser<sup>473</sup> phospho-AKT (1:1000; Cell Signaling Technology), polyclonal rabbit anti phospho-ERK1/2 (1:500; Cell Signaling Technology), polyclonal rabbit anti-Ser 133 phospho-CREB (1:1000; Millipore), monoclonal mouse anti-Ser 183 phospho-Elk-1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal mouse anti-Tyr<sup>705</sup> phospho-STAT3 (1:500; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal rabbit anti-cleaved caspase 3 (ref.9661, 1:1000; Cell Signaling Technology), and polyclonal rabbit anti-IGF-1R $\beta$ (3027; 1:1000; Cell Signaling Technology), was incubated overnight at +4°C in the above blocking medium. Membranes were rinsed in 0.1% Tween 20 in TBS for  $3 \times 10$  min at room temperature and then incubated in horseradish peroxidase-conjugated goat secondary antibody directed against mouse immunoglobulins (1:5000; Bio-Rad) and directed against rabbit immunoglobulins (1:20,000; Jackson ImmunoResearch) in 0.1% Tween 20 in TBS for 1 h at room temperature. Bound antibody complexes were developed using the ECL system (GE Healthcare) and exposed to hyperfilm ECL-plus x-ray film (GE Healthcare).

In some instances, membranes were stripped after immunoblotting with phospho-AKT, phospho-ERK1/2, phospho-CREB, phospho-Elk-1, and phospho-STAT3 by incubation in stripping buffer (100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) for 30 min at +55°C with agitation and membranes were then blocked and reprobed with polyclonal rabbit anti-AKT (1:1000; Cell Signaling Technology), polyclonal rabbit anti-ERK1/2 (1:500; Cell Signaling Technology), polyclonal rabbit anti-CREB (1:1000; Millipore), monoclonal mouse anti-

 $\leftarrow$ 

Elk-1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit anti-STAT3 (1:500; Cell Signaling Technology) and monoclonal mouse anti-GAPDH (1:2000, sc-32233, Santa Cruz Biotechnology). The optical density (OD) of each specific band was quantified with ImageJ, subtracted to the back-ground, and divided by the OD of corresponding GAPDH bands. The values for respective controls were set as 1 and the values for the other groups were normalized by the control and expressed as fold change. The number of animals in each group (*n*) was obtained by performing independent experiments using different membranes in which each group was compared with the control.

ChIP. Ventral lumbar spinal cord samples were chopped into small pieces with a scalpel and fixed for 15 min in 1% formaldehyde. Tissues were washed 3 times in cold PBS containing protease inhibitors (2 mM PMSF, 50  $\mu$ g/ml leupeptin, 50  $\mu$ g/ml pepstatin A, and 50  $\mu$ g/ml aprotinin) and collected by centrifugation. Cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 300 µl of 85 mM KCl, 0.5% NP-40, 5 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanosulfonic acid; PIPES), pH 8.0, in the presence of protease inhibitors (2 mM PMSF, 50 µg/ml leupeptin, 50 µg/ml pepstatin A, and 50 µg/ml aprotinin). After incubation on ice for 10 min, cells were sonicated 6 times for 30 s using Bioruptor (Diagenode). Lysates were cleared by centrifugation and DNA concentration was determined by nanodrop spectrophotometer. ChIP-Adembeads (Ademtech) were incubated for 15 min at room temperature with blocking buffer on a rotating wheel. Beads were resuspended in 125  $\mu$ l of ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1% Triton X100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1) and, after 1 h of incubation, equal amounts of DNA diluted 10 times in dilution buffer were added. DNA was incubated overnight at +4°C on a rotating wheel with 1  $\mu$ g of the following antibodies: polyclonal rabbit anti-Ser<sup>133</sup> phospho-CREB (Millipore), monoclonal mouse anti-Ser<sup>183</sup> phospho-Elk-1 (Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit antiacetyl-histone H3 (Millipore), and polyclonal rabbit-acetyl-histone H4 Lys8 (Millipore). Beads were washed sequentially in 150 mM NaCl TSE (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, with 500 mM NaCl TSE), buffer A (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 1 mm EDTA, 10 mm Tris-Hcl, pH 8.1), and 2 times with Tris-EDTA, pH 8.1, and then selectively eluted with 200  $\mu l$  of 1% SDS and 0.1  $\rm \scriptscriptstyle M$ NaHCO<sub>3</sub>. Cross-links were reversed by heating at +65°C for 4 h after adding NaCl at a 200 mM final concentration. After treatment with proteinase K (50 µg/ml) for 1 h at +37°C, DNA was purified using Geneclean Turbo Kit (Q-Biogene; MP Biomedicals). Real-time qRT-PCR analysis of inputs or immunoprecipitated DNAs was performed.

*qRT-PCR analysis.* Ventral lumbar spinal cord samples were chopped into small pieces with a scalpel and RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen). Each RNA preparation was treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega). One microgram was reverse transcribed with random primers (Promega) and reverse transcriptase M-MLV-RT (Invitrogen).

qRT-PCR was performed with standard protocols using SYBRGreen ROX Mix (ABgene) as a fluorescent detection dye in an ABI Prism 7000 in a final volume of 10  $\mu$ l, which also contained 300 nM of the following primers (Operon): SMN2 exon 4-exon 5 segment forward: 5'-TGTGT TGTGGTTTACACTGG-3'; SMN2 exon 4-exon 5 segment reverse: 5'-TATTTCCAGGAGACCTGGAG-3'; SMN2 exon 7-exon 8 segment forward: 5'-AAAAAGAAGGAAGGTGCTCAC-3'; SMN2 exon 7-exon 8 segment reverse: 5'-GCCTCACCACCGTGCTGG-3'; Igf-1r forward: 5'-GCATCTGATCATTGCTCTG-3'; Igf-1r reverse: 5'-GCCCAACCT GCTGTTATTTC-3'; 18S forward: 5'-GTAACCCGTTGAACCCCATT-3'; 18S reverse: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'; SMN2 promoter site 1 [-2667nu to -2401nu] forward: 5'-GAGAGAGTTCCAGGAGT CAA-3'; SMN2 promoter site 1 [-2667nu to -2401nu] reverse: 5'-GTCTCAAACTCGGTTGCTT-3'; SMN2 promoter site 2 [+160nu to +503nu] forward: 5'-TCGTAGAAAGCGTGAGAAGT-3'; SMN2 promoter site 2 [+160nu to +503nu] reverse: 5'-AAAACGCGGACCACA ACTC-3'. The relative amounts of DNA in samples were determined on the basis of the threshold cycle for each PCR product (Ct).

*Statistical analysis*. All values are displayed as mean  $\pm$  SEM within each group (Systat version 8.0; SPSS). A Kolmogorov–Smirnov normal distribution analysis was performed on all data, followed by either a Student's *t* test for normally distributed data or a nonparametric Kruskal–Wallis

<sup>(</sup>*Figure legend continued.*) **C**, Weight curve of *lgf-1r*<sup>+/+</sup> and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> control (left) and SMA (right) mice until SMA death (n = 40). **D**, Grip time of *lgf-1r*<sup>+/+</sup> and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> control (left) and SMA (right) mice until SMA death (D; n = 20). **E**, Total number of squares crossings during 5 min in the open-field test for *lgf-1r*<sup>+/+</sup> and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> control (left) and SMA (right) mice until SMA death (D; n = 20). **E**, Total number of squares crossings during 5 min in the open-field test for *lgf-1r*<sup>+/+</sup> and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> control (left) and SMA (right) mice until SMA death (**E**; n = 20). **F**–**I**, Immunodetection of ChAT-positive motor neurons in the lumbar spinal cord (L1–L5) of *lgf-1r*<sup>+/+</sup> (**F**) and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> control mice (**G**) compared with *lgf-1r*<sup>+/+</sup> (**H**) and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> SMA mice (**1**) at 12 d of age (n = 10. Scale bar, 50  $\mu$ m. **J**, **K**, Quantitative analysis of the number (**J**) and the cell body area (**K**) of motor neurons per ventral horn in the ventral lumbar spinal cord of *lgf-1r*<sup>+/+</sup> and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> control mice compared with *lgf-1r*<sup>+/+</sup> and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> SMA mice at 12 d of age (n = 10). **L**, **M**, Western blot analysis (**L**) and quantification (**M**) of cleaved caspase-3 protein expression in the ventral lumbar spinal cord of *lgf-1r*<sup>+/+</sup> and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> SMA mice at 12 d of age (n = 10). **L**, **M**, Western blot analysis (**L**) and gue (n = 4). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. Data are represented as mean  $\pm$  SEM and significance is reported versus *lgf-1r*<sup>+/+</sup> control mice (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

J. Neurosci., August 26, 2015 • 35(34):12063-12079 • 12069



test to verify significant differences between groups. Survival analysis was performed using Kaplan–Meier analysis.

### Results

## The IGF-1R is overexpressed in the spinal cords of SMA-like mice

We first analyzed the distribution of *Igf-1r* transcripts using *in situ* hybridization in the spinal cords of SMA-like and control mice at P12 (Fig. 1A, left). We found that *Igf-1r* mRNAs were significantly overexpressed in the spinal cords of SMA-like mice throughout the cord, including the motor column cells. We next analyzed the *Igf-1r* expression level by qRT-PCR in the ventral horn of the lumbar spinal cords of SMA-like mice and controls. There was a 2.5-fold increase in *Igf-1r* expression in SMA spinal cords compared with controls (Fig. 1B). *Igf-1r* mRNA overexpression in SMA mouse spinal cords was confirmed at the protein level with a 1.6-fold increase (Fig. 1C,D).

We then recorded the evolution of IGF-1R expression levels in a physiological neuroprotective paradigm for SMA-like mice based on physical exercise (Grondard et al., 2005). Submitting control and SMA-like mice to a daily running protocol led to a significant reduction in IGF-1R overexpression in the spinal cords of SMA-like mice (Fig. 1A, right, B–D). Because the reduction in IGF-1R expression could be the direct consequence of the exercise-induced enhancement of the ligand expression, we measured the circulating IGF-1 concentrations through ELISA quantifications (Fig. 1F). We found that, in striking contrast to controls, the level of circulating IGF-1 remained significantly lower in SMA compared with control mice, with no detectable change in trained compared with untrained SMA-like mice.

Most interestingly, SMN protein expression levels were inversely proportional to IGF-1R expression levels in the spinal cords of sedentary and trained SMA-like mice (Fig. 1C-E).

## Strategy for genetically reducing IGF-1R expression in SMA-like mice

To determine whether the IGF-1R expression level might be involved in SMA pathogenesis, we created a new SMA-like mouse

 $\leftarrow$ 

model in which one allele of the *Igf-1r* gene was inactivated  $(Smn^{\Delta 7/\Delta 7} SMN2 Igf-1r^{+/-}; Fig. 1G)$ . In this new mouse strain, IGF-1R expression was reduced by 4-fold in the SMA spinal cord, reaching a level comparable to *Igf-1r^{+/-}* controls, as evidenced by qRT-PCR and Western blot (Fig. 1*H–J*). We next investigated whether altering IGF-1R expression would change circulating IGF-1 concentrations through ELISA quantifications (Fig. 1*K*). We found that, in striking contrast to controls, the level of circulating IGF-1 remained significantly lower in SMA regardless of the IGF-1R expression level.

# Genetically reducing IGF-1R expression strikingly prolongs survival and improves the motor behavior of SMA mice

The impact of IGF-1R reduction on the life span of SMA mice was then investigated. As expected in this new strain, SMA mice lived no longer than 15 d (Fig. 2*A*, *B*), as reported for the original severe SMA-like mouse strains (Hsieh-Li et al., 2000). Reducing IGF-1R expression significantly increased survival of SMA mice (Fig. 2*A*, *B*). The mean survival increased from 10.9  $\pm$  2.2 d for SMA mice to 21.5  $\pm$  5.3 d for the *Igf-1r<sup>+/-</sup>* SMA, which represented a 2-fold increase in lifespan. Furthermore, the IGF-1R reduction, in striking contrast to controls (data not shown), led to a significant and progressive increase in the body weight of *Igf-1r<sup>+/-</sup>* SMA mice until death (Fig. 2*C*). All these effects were similar regardless of sex.

We then questioned whether the reduction in IGF-1R expression would improve the motor behavior of the SMA mice. We tested all groups of mice on both the grip strength and the open field tests. We found that, in contrast to SMA mice, which were unable to grip the metal rod efficiently, the grip time of *Igf-1r<sup>+/-</sup>* SMA progressively increased up to 17  $\pm$  3 s at P19 and then stabilized until death (Fig. 2*D*). Again, whereas SMA mice displayed a strongly reduced exploratory activity compared with age-matched controls, the *Igf-1r<sup>+/-</sup>* SMA mice displayed a progressive increase in exploratory behavior until P20, decreasing thereafter until death (Fig. 2*E*).

## Reducing IGF-1R expression protects motor neurons in SMA mice

We next compared the number of ChAT-positive motor neurons in the ventral spinal cords of SMA,  $Igf-1r^{+/-}$  SMA, control and Igf- $1r^{+/-}$  control mice at P12 (Fig. 2F–J). As observed in the original SMA mouse strain (Hsieh-Li et al., 2000), we found a 34% loss of motor neurons in spinal cords of SMA mice compared with controls (Fig. 2J). In contrast,  $Igf-1r^{+/-}$  SMA mice only showed a 10% reduction in the number of motor neurons, suggesting that reducing IGF-1R expression significantly reduced the extent of motor neuron death in SMA mice. Furthermore, the evaluation of motor neuron cell body area provided evidence of a persistent atrophy of the motor neurons in the ventral horn of the spinal cords in SMA mice compared with control mice at P12 (Fig. 2K). In contrast, the extent of atrophy was significantly reduced in  $Igf-1r^{+/-}$  SMA mice. No difference could be observed in the number and size of motor neurons in control and Igf- $1r^{+/-}$  control mice at the same age (Fig. 2*J*,*K*).

To determine whether the reduction of IGF-1R level interfered with the apoptotic process in the spinal cords of SMA mice, we evaluated the activation of the caspase-3 in the ventral spinal cords of SMA and *Igf-1r<sup>+/-</sup>* SMA mice. As shown in Fig. 2, *L* and *M*, the IGF-1R reduction reduced the extent of the apoptotic process in SMA mouse spinal cords.

Figure 3. Genetic reduction of IGF-1R expression promotes SMN expression in mouse SMA spinal cords. A, B, Western blot analysis (A) and quantification (B) of SMN protein expression in the ventral lumbar spinal cords of  $lgf-1r^{+/+}$  and  $lgf-1r^{+/-}$  control mice compared with *lqf*-1 $r^{+/+}$  and *lqf*-1 $r^{+/-}$  SMA mice at 12 d of age (n = 4). **C**-**E**, Western blot analysis (**C**) and quantification of IGF-1RB (D) and SMN (E) protein expression in MN-1 cell culture transfected with either a nonrelevant siRNA (siRNA Control) or an siRNA against *lqf-1r* (siRNA *lqf-1r; n* = 3). F, Immunodetection of SMN protein (SMN, green) in the nucleus (DAPI, blue) of ChAT-positive motor neurons (red) in the lumbar spinal cord (L1–L5) of *lgf-1r*<sup>+/+</sup> and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> control mice (left) compared with *lgf-1r*<sup>+/+</sup> and *lgf-1r*<sup>+/-</sup> SMA mice (right) at 12 d of age (n = 4). Scale bar, 25  $\mu$ m. **G**, Number of Gems per nucleus of ChAT-positive motor neurons in the ventral lumbar spinal cord of  $lgf-1r^{+/+}$  and  $lgf-1r^{+/-}$  control mice compared with  $lgf-1r^{+/+}$  and *lqf-1r*<sup>+/-</sup> SMA mice at 12 d of age (100 motor neurons per mouse; n = 4). *H*–*J*, Quantification by real-time 1RT-PCR of the E7-E8 segment containing SMN transcripts normalized either by the E4 – E5 segment containing SMN transcripts (H) or by 18S transcripts (I) and of total E4 – E5 segment SMN transcripts normalized by 18S transcripts (J) in the ventral lumbar spinal cord of *Igf-1r*  $^{+/+}$  and *Igf-1r*  $^{+/-}$  control mice compared with *Igf-1r*  $^{+/+}$  and *Igf-1r*  $^{+/-}$  SMA mice at 12 d of age (n = 10). K–M, Western blot analysis (K) and quantification of IGF-1R $\beta$  (L) and SMN (M) protein expression in primary culture of myotubes from human SMA patient transfected with either a nonrelevant siRNA (siRNA Control) or an siRNA against IGF-1R (siRNA IGF-1R; n = 3). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. Data are represented as mean  $\pm$  SEM and significance is reported versus *lgf-1r*<sup>+/+</sup> control mice or siRNA control MN-1 or siRNA control myotube-transfected cells, respectively (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).



Figure 4. Genetic reduction of IGF-1R expression restores intracellular pathway activation profile and promotes phospho-CREB-binding on *SMN2* promoter in the spinal cords of SMA mice. *A*, *B*, Western blot analysis (*A*) and quantification (*B*) of ERK protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cords of *IgF-1r*<sup>+/+</sup> and *IgF-1r*<sup>+/-</sup> control mice compared (*Figure legend continues*.)

### Reducing IGF-1R expression enhances SMN protein expression in the spinal cords of SMA mice and in human myotubes

We next analyzed the impact of IGF-1R reduction on the SMN expression profile in the spinal cords of all four groups at P12. The increase in SMN protein level induced by IGF-1R reduction was clearly evidenced by the Western immunoblot analysis performed at the lumbar spinal cord level (Fig. 3*A*,*B*). A 2-fold increase in SMN expression level was observed in *Igf-1r<sup>+/-</sup>* SMA mice compared with SMA mice, but it remained 50% lower than controls. Unexpectedly, IGF-1R reduction was unable to enhance SMN expression in controls, as shown in the spinal cords of *Igf-1r<sup>+/-</sup>* control mice compared with *Igf-1r<sup>+/+</sup>* control mice, but also in MN1 culture, which arbors only the two alleles of the murine *Smn* gene and for which *Igf-1r* depletion by a specific siRNA resulted in a slight decrease in SMN (Fig. 3*C*–*E*).

To investigate whether the IGF-1R reduction-induced increase in SMN expression in SMA spinal cords occurred in motor neurons, we compared the number of Gemini of coiled-bodies (Gems) per nucleus in ChAT-positive neuron within the ventral spinal cords of SMA, *Igf-1r<sup>+/-</sup>* SMA, control and *Igf-1r<sup>+/-</sup>* control mice at P12 (Fig. 3 *F*, *G*). Consistent with the values we found in the original SMA mouse strain (Hsieh-Li et al., 2000; Grondard et al., 2005), from 0 to 1 Gems per nucleus (0.6 ± 0.1 on the average) could be counted in SMA, contrasting with up to 2.0 ± 0.1 in control. Therefore, reducing IGF-1R expression increased the number of Gems per nucleus by almost 1, reaching 1.4 ± 0.1 in *Igf-1r<sup>+/-</sup>* SMA motor neurons (Fig. 3*G*).

To determine whether the increased SMN protein level resulted from an increase in *SMN* transcript steady-state levels and/or from a modulation of the exon-7 inclusion in *SMN* transcripts, we quantified the fraction of exon-7-containing mRNA inside the population of *SMN* transcripts using qRT-PCR aimed at amplifying either the exon 4–exon 5 segment (E4– E5) or the E7–E8 segment in the ventral spinal cords of SMA, *Igf-1r<sup>+/-</sup>* SMA, controls and *Igf-1r<sup>+/-</sup>* control mice at P12 (Fig. 3*H–J*). We found that the reduction of IGF-1R did increase both the steady-state level of SMN transcripts (Fig. 3*J*) and also the relative level of exon-7-containing *SMN* transcripts (Fig. 3*H,I*). Finally, in agreement with our findings in mice, the siRNAinduced depletion of *IGF-1R* transcripts in a myotube culture of paravertebral muscles from type 2 SMA patient resulted in a significant SMN expression increase (Fig. 3*K*–*M*).

## Genetically reducing IGF-1R expression shifts the equilibrium among ERK, JAK, and AKT signaling pathways in SMA spinal cords

To investigate whether the modulation of IGF-1R expression level affected the activation profile of the intracellular pathways downstream of the receptor, we analyzed the phosphorylation status of ERK, STAT3, and AKT in the spinal cords in all four groups at P12 (Fig. 4A-F). We found that, in the spinal cords of SMA mice, ERK (Fig. 4A, B) and STAT3 (Fig. 4E, F) phosphorylation status were consistently higher and those of AKT (Fig. 4C,D) were consistently lower compared with controls. Reducing IGF-1R expression in the spinal cords of SMA mice resulted in a >2-fold increase in AKT phosphorylation (Fig.  $4C_{D}$ ), a 25% decrease of ERK phosphorylation (Fig. 4A, B), and a 2-fold decrease of STAT3 phosphorylation (Fig. 4E, F). Accordingly, the p-AKT/total AKT ratio increased and the p-ERK/total ERK, pSTAT-3/total STAT3 ratios decreased in the spinal cords of Igf- $1r^{+/-}$ SMA mice, reflecting an increase in the activity level of AKT and conversely a decrease in the activity level of ERK and JAK pathways. Unexpectedly, IGF-1R reduction had no effect on the activation profile of ERK and AKT pathways in control spinal cords, contrasting with the previous data in mouse  $Igf-1r^+$ fibroblasts (Holzenberger et al., 2003).

We next investigated whether this shift from ERK to AKT, induced by IGF-1R reduction, could influence SMN expression. Indeed, phospho-ERK and phospho-AKT activate by phosphorylation the transcription factors Elk-1 and CREB, respectively, resulting in their binding to their specific sites on SMN2 gene promoter and thus altering SMN expression in SMA spinal cords (Branchu et al., 2013). In the SMA background, activated Elk-1 was thought to exert a repressive role on SMN2 gene transcription, contrasting with the activating role of CREB (Branchu et al., 2013). As expected, we found that the activation level of Elk-1 and CREB paralleled those of their respective activating kinases in the spinal cords of all four groups (Fig. 4G–J). Furthermore, the level of Elk-1 binding on the SMN2 promoter, which was originally found to be higher in SMA compared with controls, was significantly lowered by IGF-1R reduction, as evidenced by ChIP analysis (Fig. 4K, L). In contrast, the level of CREB binding on the SMN2 promoter, originally found to be lower in SMA compared with controls, was significantly increased by IGF-1R reduction (Fig. 4M, N). Expectedly, the CREB binding on the SMN2 promoter was correlated with a significant increase in histone H3 and H4 acetylation (Fig. 4O-R), suggesting a chromatin remodeling at the SMN2 promoter level.

# Reducing IGF-1R expression improves the NMJ phenotype in SMA mice

Because alteration of the NMJ development is at present considered to be a hallmark of SMA pathogenesis in patients (Kariya et al., 2008) and in mouse models (Biondi et al., 2008; Kariya et al., 2008; Kong et al., 2009), we analyzed shape and surface of the NMJs, as described previously (Sanes and Lichtman, 1999; Biondi et al., 2008). The developmental changes in the synapse shape from an immature, uniform plaque of AChRs (Fig. 5*A*) to a perforated large plaque of AChRs (Fig. 5*B*) that eventually adopts a pretzel-like form (Fig. 5*C*) were determined for innervated NMJs using  $\alpha$ -bungarotoxin staining of the two extensor

<sup>~</sup> 

<sup>(</sup>Figure legend continued.) with lgf-1r<sup>+/+</sup> and lgf-1r<sup>+/-</sup> SMA mice at 12 d of age (n = 5).  $\boldsymbol{\zeta}$ , D, Western blot analysis (C) and quantification (D) of AKT protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cords of  $lqf-1r^{+/+}$  and  $lqf-1r^{+/-}$  control mice compared with  $lqf-1r^{+/+}$  and *lqf-1r* +/- SMA mice at 12 d of age (n = 5). **E**, **F**, Western blot analysis (**E**) and quantification (F) of STAT3 protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cords of  $lqf-1r^{+/+}$  and *Igf-1r*<sup>+/-</sup> control mice compared with *Igf-1r*<sup>+/+</sup> and *Igf-1r*<sup>+/-</sup> SMA mice at 12 d of age (n = 5). **G**, **H**, Western blot analysis (**G**) and quantification (**H**) of Elk-1 protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cords of  $lgf-1r^{+/+}$  and  $lgf-1r^{+/-}$  control mice compared with *lqf-1r*<sup>+/+</sup> and *lqf-1r*<sup>+/-</sup> SMA mice at 12 d of age (n = 5). *I*, *J*, Western blot analysis (*I*) and quantification (J) of CREB protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cords of lgf- $1r^{+/+}$  and  $lqf-1r^{+/-}$  control mice compared with  $lqf-1r^{+/+}$  and  $lqf-1r^{+/-}$  SMA mice at 12 d of age (n = 5). K-N, ChIP analysis of phospho-Elk-1 (K, L) and phospho-CREB (M, N) in the ventral lumbar spinal cords of  $lqf-1r^{+/+}$  and  $lqf-1r^{+/-}$  control mice compared with  $lqf-1r^{+/-}$  $1r^{+/+}$  and  $lqf-1r^{+/-}$  SMA mice at 12 d of age. Real-time qRT-PCR was performed to detect the SMN2 promoter site 1 (K, M) and site 2 (L, N; n = 12). O-R, ChIP analysis of Histone H3 ( $\mathbf{0}$ ,  $\mathbf{P}$ ) and H4 ( $\mathbf{Q}$ ,  $\mathbf{R}$ ) acetylation in the ventral lumbar spinal cords of laf-1r<sup>+/</sup> and  $lgf-1r^{+/-}$  control mice compared with  $lgf-1r^{+/+}$  and  $lgf-1r^{+/-}$  SMA mice at 12 d of age. Real-time gRT-PCR was performed to detect SMN2 promoter site 1 (**0**, **Q**) and site 2 (P, R; n = 12). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. Data are represented as mean  $\pm$  SEM and significance is reported versus *lgf-1r*<sup>+/+</sup> control mice (\*p < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).



**Figure 5.** Genetic reduction of IGF-1R expression accelerates NMJ maturation in SMA mice. A-G, Motor end-plate labeling with  $\alpha$ -bungarotoxin (left) and anti-neufilament plus antisynaptophysin antibodies (right), representing "Uniform-plaque" (A), "Perforated-plaque" (B), and "Pretzel-like plaque" (C), in the soleus of *Igf-1r*<sup>+/+</sup> (*Figure legend continues*.)

muscles, the slow-twitch soleus (Fig. 5D-G) and fast-twitch plantaris and the flexor fast-twitch tibialis in all four groups of mice at P12. We found that up to 63% of the NMJs were elliptical, made of uniform plaques of AChRs, in the two extensors muscles of SMA mice at P12 (Fig. 5H, J). As expected for a flexor muscle at this age (Biondi et al., 2008), NMJs in the tibialis were more advanced in terms of maturation, with only 34% of immature NMJs in SMA mice (Fig. 5L). In contrast, only 32% and 11% of immature NMJs were found in extensor and flexor muscles of controls, respectively, with a number of pretzel-like form NMJs between 2% and 5% for the extensors and 10% for the flexor, as found previously in the former SMA-like mice (Biondi et al., 2008; Fig. 5H, J,L). IGF-1R reduction improved NMJ morphology in the three muscles in SMA mice, as demonstrated by the increase in NMJ perforation (Fig. 5H, J,L) and enlargement (Fig. 5I, K, M) of the NMJs on the muscle fibers. These effects of IGF-1R reduction on NMJ maturation were only evidenced in SMA mice.

## Reducing IGF-1R expression improves the muscle phenotype in SMA mice

Finally, we examined in all four groups of mice at P12 whether the IGF-1R reduction could alleviate SMA-induced muscular impairments, including muscle aplasia, atrophy, and typology alteration. As evidenced by the phenotypic analysis of H&E-stained soleus, plantaris, and tibialis (Fig. 6A–D), reducing IGF-1R expression in SMA mice was sufficient to counteract muscle aplasia (Fig. 6E) and to reduce muscle atrophy significantly by 50% in soleus and plantaris and by 100% in tibialis (Fig. 6F). We then looked at the muscle maturation rate through the analysis of the different MyHC distribution, including the embryonic; neonatal; and adult I, II IIa, and IIx/IIb isoforms (Fig. 6G-L). In SMA mice, consistent with our previous results in the original SMA mouse strain (Biondi et al., 2008), we found an increase in embryonic (20%, 13%, and 10% for soleus, plantaris, and tibialis, respectively) and type I (5% and 13% for soleus and plantaris, respectively) MyHC-expressing myofibers compared with control mice. These alterations were associated with a decrease in myofibers expressing the neonatal (15%, 20%, and 12% for soleus, plantaris, and tibialis, respectively) and type II (5% and 15% for soleus and plantaris, respectively) isoforms, suggesting, as expected, an overall muscle maturation delay (Fig. 61, J). Reducing IGF-1R expression in SMA mice resulted in a rebalancing of the percentage of embryonic versus neonatal MyHC-expressing myofibers (Fig. 6K) and of type I versus type II, as well as among the different type II-MyHCexpressing myofibers (Fig. 6L). These data suggested that IGF-1R reduction in SMA muscles is sufficient to override the major characteristic muscular impairments of the disease.

Because a decrease of AKT activation has been reported in atrophic muscles of severe ALS patients (Yin et al., 2012), we analyzed the phosphorylation status of ERK and AKT in the tibialis of SMA, Igf- $1r^{+/-}$  SMA, control and Igf- $1r^{+/-}$  control mice at P12 (Fig. 7A–D). As in the spinal cord, reducing IGF-1R expression shifted the balance of ERK and AKT activation patterns, leading to a shift in the activation level of the transcription factors Elk-1 and CREB (Fig. 7E–H) and finally to a significant SMN expression increase in SMA muscles at the protein level (Fig. 7I,J). Interestingly, as found in the spinal cord, the IGF-1R reduction led to an increase of both the *SMN* transcript steady-state level and the proportion of exon-7-containing transcripts (Fig. 7K–M).

## Discussion

This study provides the first lines of evidence that, regardless of the circulating IGF-1 level, which remained dramatically low in SMA compared with controls, the reduction of IGF-1R expression, be it at the physiological (through physical exercise) or genetic level, significantly protects motor neurons from SMAinduced cell death. Unexpectedly, reducing the first steps of IGF-1 axis activation, instead of resulting in an unselective depression of the three intracellular pathways known to lie downstream the receptor, exerted a specific effect on each pathway, leading to an alteration of the overall activation balance. These results suggest a crucial role of the surface receptor expression levels in the selective activation or depression of a given downstream intracellular pathway. In the specific case of SMA, IGF-1R reduction led to AKT/CREB pathway activation, which was associated with ERK and JAK inhibition in the spinal cord and skeletal muscle, both events contributing to the significant increase of SMN expression. This was most notable in in motor neurons, as revealed by Gem counts, neuroprotection, and subsequent benefits for SMAlike mice in terms of lifespan and motor behavior (Fig. 8).

On the basis of accumulating in vitro evidence, it is well known that all types of cells in the CNS are targeted by IGF-1, including motor neurons (Kaspar et al., 2003; Rabinovsky et al., 2003; Dobrowolny et al., 2005; Ozdinler and Macklis, 2006). Whereas, for many years, canonical signaling through the IGF-1 receptors was considered to include the PI3K/AKT, Ras/ERK, and, more recently, the JAK/STAT pathways (Himpe and Kooijman, 2009), the signaling network elicited by IGF-1 is likely to be differentially activated depending on the cell context, making it difficult to predict the pathway that will ultimately be triggered and thus which biological effect will result. The present data suggest that there are some cell-specific events in which intracellular signaling routes triggered downstream of IGF-1R might depend on the expression levels of the receptor at the cell surface. Reducing IGF-1R expression results in the shift from both ERK and JAK to the AKT pathway and in a parallel alteration of their signaling cascade, leading to Elk-1, STAT, and CREB phosphorylation, respectively. This IGF-1R reduction-induced shift in intracellular pathways occurred only in SMA tissues and not in controls, regardless of tissue origin (e.g., human or murine, spinal cord or muscle). The reasons underlying this discrepancy remain unknown. However, in all of the conditions explored here, an IGF-1R reduction effect on the intracellular pathway activation profile was only found when these pathways were constitutively imbalanced (i.e., ERK overactivation and AKT underactivation). This imbalance could be essential for an IGF-1R reduction effect in restoring the selective pathway activation, ultimately resulting in SMN expression increase. In addition, and most unexpectedly, the IGF-1R reduction in control spinal cords and muscles did not result in half of the activation rate of ERK and AKT, as was reported previously in fibroblasts (Holzenberger et al., 2003), sug-

*<sup>(</sup>Figure legend continued.*) control mice (**D**), *lgf-1r<sup>+/-</sup>* control mice (**E**), *lgf-1r<sup>+/+</sup>* SMA mice (**F**), and *lgf-1r<sup>+/-</sup>* SMA mice (**G**) at 12 do fage. Scale bars, 10  $\mu$ m for high magnifications, 25  $\mu$ m for low magnifications, and 5  $\mu$ m for crops. **H**, **I**, Determination of the NMJ maturation (**H**) and area (**I**) in the soleus muscle from *lgf-1r<sup>+/+</sup>* and *lgf-1r<sup>+/-</sup>* control mice compared with *lgf-1r<sup>+/+</sup>* and *lgf-1r<sup>+/++</sup>* and *lgf-1r<sup>+/++</sup>* and *lgf-1r<sup>+/++</sup>* and *lgf-1r<sup>+/++</sup>* and *lgf-1r<sup>+/++</sup>* and *lgf-1r<sup>+/+++</sup>* and *lgf-1r<sup>+/++++</sup>* and *lgf-1r<sup>+/++++</sup>* and

J. Neurosci., August 26, 2015 • 35(34):12063-12079 • 12075



**Figure 6.** Genetic reduction of IGF-1R expression limits muscle impairments and accelerates muscle maturation in SMA mice. A-D. H&E staining on the tibialis of  $lgf-1r^{+/+}$  control mice (A),  $lgf-1r^{+/-}$  control mice (B),  $lgf-1r^{+/+}$  SMA mice (C), and  $lgf-1r^{+/-}$  SMA mice (D) at 12 d of age. Scale bar, 25  $\mu$ m. E, F, Total number (E) and cross-sectional area (F) of myofibers in the soleus, plantaris, and tibialis muscles from control mice compared with  $lgf-1r^{+/+}$  SMA mice (I), and  $lgf-1r^{+/-}$  SMA mice (I) and  $lgf-1r^{+/-}$  SMA mice (I), and  $lgf-1r^{+/-}$  SMA mice (I) and  $lgf-1r^{+/-}$  SMA mice (I), and  $lgf-1r^{+/-}$  SMA mice (I) at 12 d of age. Scale bar, 50  $\mu$ m. K, L. Analysis of developmental (i.e., embryonic and neonatal; K) and adults (i.e., I, II, IIa and IIx/IIb; L) MyHC isoforms typology of the soleus, plantaris, and tibialis of control mice compared with  $lgf-1r^{+/-}$  SMA mice at 12 d of age (n = 4). Data are represented as mean  $\pm$  SEM and significance is reported versus  $lgf-1r^{+/+}$  control mice (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

gesting a cell-specific adaptation to the modulation of IGF-1R expression.

Whatever the molecular mechanism of the signal transduction switch, IGF-1R reduction results in the activation of the AKT/CREB pathway and the inhibition of the ERK/Elk-1 pathway in SMA tissues. In all likelihood, the resulting CREB activation led to its increased binding to the *SMN2* promoter and, conversely, the Elk-1 inhibition to its binding decrease. This shift

12076 • J. Neurosci., August 26, 2015 • 35(34):12063-12079



**Figure 7.** Genetic reduction of IGF-1R expression restores the intracellular pathway activation profile in the skeletal muscle tibialis in SMA mice. *A*, *B*, Western blot analysis (*A*) and quantification (*B*) of ERK protein phosphorylation in the tibialis muscle of lgf- $1r^{+/+}$  and lgf- $1r^{+/-}$  control mice compared with lgf- $1r^{+/+}$  and lgf- $1r^{+/-}$  SMA mice at 12 dof age (n = 4). *C*, *D*, Western blot analysis (*C*) and quantification (*D*) of AKT protein phosphorylation in the tibialis muscle of lgf- $1r^{+/+}$  and lgf- $1r^{+/-}$  control mice compared with lgf- $1r^{+/-}$  SMA mice at 12 dof age (n = 4). *E*, *F*, Western blot analysis (*C*) and quantification (*F*) of Elk-1 protein phosphorylation in the tibialis muscle of lgf- $1r^{+/+}$  and lgf- $1r^{+/-}$  control mice compared with lgf- $1r^{+/-}$  SMA mice at 12 dof age (n = 4). *E*, *F*, Western blot analysis (*G*) and quantification (*F*) of Elk-1 protein phosphorylation in the tibialis muscle of lgf- $1r^{+/+}$  and lgf- $1r^{+/-}$  control mice compared with lgf- $1r^{+/-}$  SMA mice at 12 dof age (n = 4). *I*, *J*, Western blot analysis (*G*) and quantification (*J*) of SRN protein expression in the tibialis muscle of lgf- $1r^{+/+}$  and lgf- $1r^{+/-}$  and lgf- $1r^{+/-}$  and lgf- $1r^{+/-}$  SMA mice at 12 dof age (n = 4). *L*, *A*, M, Quantification by real-time qRT-PCR of the E7–E8 segment containing *SMN2* transcripts normalized either by the E4–E5 segment containing *SMN2* transcripts (*M*) or by 185 transcripts (*L*) and for tal E4–E5 segment solut and lgf- $1r^{+/-}$  and lgf- $1r^{+/-}$  SMA mice at 12 dof age (n = 8). Dotted lines on Western blot images symbolize some removed interspacing lanes for a side-by-side display of samples from all groups. Data are represented as mean ± SEM and significance is reported versus lgf- $1r^{+/+}$  control mice (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).



**Figure 8.** The modulation of IGF-1R expression levels is sufficient to restore the AKT/CREB and ERK/Elk-1 intracellular signaling pathway activation profile, resulting in SMN expression increase in SMA mice. A-C, Proposed mechanisms involved in the increase of SMN expression induced by the genetic reduction of IGF-1R expression in severe SMA-like mice. Modulation of the activation profile of ERK/Elk-1 and AKT/CREB signaling pathways in control (A) compared with  $lqf-1r^{+/+}$  (B) and  $lqf-1r^{+/-}$  SMA (C) mice at 12 d of age. Large characters indicate activated molecules.

in transcription factor binding was followed by increased acetylation of H3 and H4 histones on sites that are involved in the control of SMN2 transcription (Majumder et al., 2004; Branchu et al., 2013), ultimately resulting in a significant increase in SMN expression. All of these molecular events resulting from the IGF-1R reduction occurred only in SMA and not in controls, in which the intracellular signaling pathways are not altered after IGF-1R expression decrease. Therefore, in SMA only, the IGF-1R reduction correlated with both an increase in SMN steady-state level, strongly suggesting an SMN2 transcriptional activation, and an increase in exon-7 inclusion in SMN2 transcripts, suggesting a modulation of the splicing process. This dual effect on SMN2 gene expression, both transcriptional and posttranscriptional, is unexpected in this mouse model at this age when one considers the effects of NMDA receptor activation in  $(Smn^{\Delta 7/\Delta})$ SMN2) mice at P12. In that case, the NMDA-induced activation of the AKT/CREB pathway specifically enhanced exon-7 inclusion in SMN transcripts without any observable effect on SMN steady-state levels (Biondi et al., 2010). A probable effect on the SMN2 gene transcription upon CREB phosphorylation induced either by NMDA receptor activation (Biondi et al., 2010) or ERK inhibition (Branchu et al., 2013) was only found during the first week (P6) in another severe mouse model of SMA. Clearly, identifying the mechanisms underlying IGF-1R reduction effects on the control of SMN2 expression may provide new tools aimed at modulating SMN2 gene expression trough transcriptional and posttranscriptional mechanisms.

Furthermore, whereas the ERK/Elk-1, JAK/STAT, and AKT/ CREB pathways have all been correlated to neuroprotection, it is today widely admitted that IGF-1-mediated neuroprotection occurs through activation of the AKT/CREB pathway (D'Mello et al., 1997; Párrizas et al., 1997; Yadav et al., 2005). Furthermore, in the specific case of cerebellar granule neurons, IGF-1-induced neuroprotection results from both the activation of AKT and the inhibition of MEK-ERK1/2 through the AKT pathway (Subramaniam et al., 2005). Similarly, the neuroprotection induced by IGF-1R reduction in SMA spinal cords, as evidenced by the relative persistence of the motor neuron population and the reduced activation of caspase-3, might result from both an increased SMN protein expression and the presence of the two powerful antiapoptotic molecules, AKT and CREB, at the activated state. Although no role has been reported to date for the JAK/STAT pathway in SMA pathogenesis, the fact that it parallels the activation profile of ERK, in contrast to AKT, suggests a detrimental role of this pathway in SMA.

The present results help to predict the consequences of the dramatic overexpression of IGF-1R in muscles of severe type 1 SMA patients compared with the IGF-1R down-expression in less severe type 3 SMA patients (Millino et al., 2009) in terms of intracellular signalization, SMN expression, cell survival, and muscle maintenance. Furthermore, it could be speculated considering the present results that the constitutive underactivation of AKT recently found in the muscles of ALS patients (Yin et al., 2012) might result from muscular IGF-1R overexpression (Lunetta et al., 2012). The fact that the expression of IGF-1R was found to be dramatically increased in these two genetic motor neuron diseases is puzzling and suggests that an alteration of the IGF-1/IGF-1R equilibrium might be directly involved in motor unit destabilization, ultimately resulting in specific motor neuron death. Over the past 20 years, compelling lines of evidence have accumulated throughout the literature designating IGF-1 as one of the most powerful anti-apoptotic agents for neurons. Several groups subsequently attempted to test the potential effects of IGF-1 in alleviating the symptoms in a variety of neurodegenerative diseases including ALS (Sakowski et al., 2009) and SMA (Bosch-Marcé et al., 2011; Murdocca et al., 2012; Tsai et al., 2012). When tested in different mouse models of SMA, treatments with IGF-1 (Bosch-Marcé et al., 2011; Tsai et al., 2012) or the IGF-1/IGF-BP3 complex (Murdocca et al., 2012) gave rise to disappointing results in terms of SMA mouse survival. Moreover, clinical trials using IGF-1 treatment failed to reduce ALS symptoms in humans (Sorenson et al., 2008; Howe et al., 2009). This paradoxical lack of IGF-1 effects might be due to an aberrant expression of IGF-1R in diseased tissues. More precisely, its overexpression might result in the activation of other, as yet unsuspected pathways that would restrict the beneficial effects of IGF-1. This newly emerging concept involving the modulation of the IGF-1R expression seems to be key for the selection of intracellular pathways and should be taken into account when designing IGF-1-based treatments for neurodegenerative diseases.

### References

- Bigot A, Klein AF, Gasnier E, Jacquemin V, Ravassard P, Butler-Browne G, Mouly V, Furling D (2009) Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. Am J Pathol 174:1435–1442. CrossRef Medline
- Biondi O, Grondard C, Lécolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C, Charbonnier F (2008)
   Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. J Neurosci 28:953–962. CrossRef Medline
- Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, Pariset C, Lécolle S, Côté J, Chanoine C, Charbonnier F (2010) In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. J Neurosci 30:11288–11299. CrossRef Medline
- Bosch-Marcé M, Wee CD, Martinez TL, Lipkes CE, Choe DW, Kong L, Van Meerbeke JP, Musarò A, Sumner CJ (2011) Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice. Hum Mol Genet 20:1844– 1853. CrossRef Medline
- Branchu J, Biondi O, Chali F, Collin T, Leroy F, Mamchaoui K, Makoukji J, Pariset C, Lopes P, Massaad C, Chanoine C, Charbonnier F (2013) Shift from extracellular signal-regulated kinase to AKT/cAMP response element-binding protein pathway increases survival-motor-neuron expression in spinal-muscular-atrophy-like mice and patient cells. J Neurosci 33:4280–4294. CrossRef Medline
- Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E, Dillin A (2009) Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. Cell 139:1157–1169. CrossRef Medline
- Corbo M, Lunetta C, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Adobbati L, Silani V (2010) Free insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding proteins-2 and -3 in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. Eur J Neurol 17:398–404. CrossRef Medline
- Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. Neurobiol Dis 3:97–110. CrossRef Medline
- D'Mello SR, Borodezt K, Soltoff SP (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. J Neurosci 17:1548–1560. Medline
- Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musarò A (2005) Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. J Cell Biol 168:193–199. CrossRef Medline
- Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. Cell 90:1023–1029. CrossRef Medline
- Fukaya M, Hayashi Y, Watanabe M (2005) NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. Eur J Neurosci 21:1432–1436. CrossRef Medline
- Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lécolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F (2005) Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. J Neurosci 25:7615–7622. CrossRef Medline
- Himpe E, Kooijman R (2009) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. BioFactors 35:76–81. CrossRef Medline
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nature 421:182–187. CrossRef Medline
- Howe CL, Bergstrom RA, Horazdovsky BF 2009 Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. Neurology 73:1247; author reply 1247– 1248. Medline
- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. Nat Genet 24:66–70. CrossRef Medline
- Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, Krainer AR (2011) Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe

spinal muscular atrophy mouse model. Nature 478:123–126. CrossRef Medline

- Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT, Monani UR (2008) Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet 17:2552–2569. CrossRef Medline
- Kaspar BK, Lladó J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH (2003) Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. Science 301:839–842. CrossRef Medline
- Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marcé M, Griffin JW, Rich MM, Sumner CJ (2009) Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. J Neurosci 29:842–851. CrossRef Medline
- Kye MJ, Niederst ED, Wertz MH, Gonçalves Ido C, Akten B, Dover KZ, Peters M, Riessland M, Neveu P, Wirth B, Kosik KS, Sardi SP, Monani UR, Passini MA, Sahin M (2014) SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway. Hum Mol Genet 23:6318–6331. CrossRef Medline
- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Cell 80: 155–165. CrossRef Medline
- Lorson CL, Androphy EJ (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. Hum Mol Genet 9:259–265. CrossRef Medline
- Lunetta C, Serafini M, Prelle A, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Sassone J, Colciago C, Moggio M, Corbo M, Silani V (2012) Impaired expression of insulin-like growth factor-1 system in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. Muscle Nerve 45:200–208. CrossRef Medline
- Majumder S, Varadharaj S, Ghoshal K, Monani U, Burghes AH, Jacob ST (2004) Identification of a novel cAMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. J Biol Chem 279:14803–14811. CrossRef Medline
- Millino C, Fanin M, Vettori A, Laveder P, Mostacciuolo ML, Angelini C, Lanfranchi G (2009) Different atrophy-hypertrophy transcription pathways in muscles affected by severe and mild spinal muscular atrophy. BMC Med 7:14. CrossRef Medline
- Murdocca M, Malgieri A, Luchetti A, Saieva L, Dobrowolny G, de Leonibus E, Filareto A, Quitadamo MC, Novelli G, Musarò A, Sangiuolo F (2012) IPLEX administration improves motor neuron survival and ameliorates motor functions in a severe mouse model of spinal muscular atrophy. Mol Med 18:1076–1085. Medline
- Neff NT, Prevette D, Houenou LJ, Lewis ME, Glicksman MA, Yin QW, Oppenheim RW (1993) Insulin-like growth factors: putative musclederived trophic agents that promote motoneuron survival. J Neurobiol 24:1578–1588. CrossRef Medline
- Oshima S, Fukaya M, Masabumi N, Shirakawa T, Oguchi H, Watanabe M (2002) Early onset of NMDA receptor GluR epsilon 1 (NR2A) expression and its abundant postsynaptic localization in developing motoneurons of the mouse hypoglossal nucleus. Neurosci Res 43:239–250. CrossRef Medline
- Ozdinler PH, Macklis JD (2006) IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. Nat Neurosci 9:1371–1381. CrossRef Medline
- Párrizas M, Saltiel AR, LeRoith D (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogenactivated protein kinase pathways. J Biol Chem 272:154–161. CrossRef Medline
- Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in premRNA splicing. Cell 95:615–624. CrossRef Medline
- Rabinovsky ED, Gelir E, Gelir S, Lui H, Kattash M, DeMayo FJ, Shenaq SM, Schwartz RJ (2003) Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. FASEB J 17: 53–55. Medline
- Sakowski SA, Schuyler AD, Feldman EL (2009) Insulin-like growth factor-I for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler 10:63–73. CrossRef Medline
- Salazar-Grueso EF, Kim S, Kim H (1991) Embryonic mouse spinal cord motor neuron hybrid cells. Neuroreport 2:505–508. CrossRef Medline

Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. Annu Rev Neurosci 22:389–442. CrossRef Medline

- Sorenson EJ, Windbank AJ, Mandrekar JN, Bamlet WR, Appel SH, Armon C, Barkhaus PE, Bosch P, Boylan K, David WS, Feldman E, Glass J, Gutmann L, Katz J, King W, Luciano CA, McCluskey LF, Nash S, Newman DS, Pascuzzi RM, et al. (2008) Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. Neurology 71:1770–1775. CrossRef Medline
- Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberté C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker K (2005) Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. J Neurosci 25: 2838–2852. CrossRef Medline
- Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG, Rosenfelder G (1984) Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. J Immunol Methods 72:471– 479. CrossRef Medline
- Tsai LK, Chen YC, Cheng WC, Ting CH, Dodge JC, Hwu WL, Cheng SH, Passini MA (2012) IGF-1 delivery to CNS attenuates motor neuron cell

death but does not improve motor function in type III SMA mice. Neurobiol Dis 45:272–279. CrossRef Medline

- Wilczak N, de Vos RA, De Keyser J (2003) Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 361:1007–1011. CrossRef Medline
- Yadav A, Kalita A, Dhillon S, Banerjee K (2005) JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3. J Biol Chem 280:31830–31840. CrossRef Medline
- Yin F, Ye F, Tan L, Liu K, Xuan Z, Zhang J, Wang W, Zhang Y, Jiang X, Zhang DY (2012) Alterations of signaling pathways in muscle tissues of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 46:861–870. CrossRef Medline
- Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, Dreyfuss G (2008) SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. Cell 133:585–600. CrossRef Medline





The Journal of Physiology

http://jp.msubmit.net

## JP-RP-2015-271361

Title: Long-term exercise-specific neuroprotection in Spinal Muscular Atrophy-like mice

Authors: Farah Chali Celine Desseille Leo Houdebine Evelyne Benoit Thais Rouquet Bruno Bariohay Philippe Lopes Julien Branchu Bruno Della Gaspera Claude Pariset Christophe Chanoine Frederic Charbonnier Olivier BIONDI

Author Conflict: No competing interests declared

Running Title: Exercise-specific adaptation of motor-unit in SMA

## Dual Publication: No

**Funding:** AXA Research Fund (Le Fonds AXA pour la Rechercher):, N°2011-DOC-UNIVERSITE PARIS DESCARTES-CHALI F; AFM-Téléthon (French Muscular Dystrophy Association): Frederic Charbonnier AXA Research Fund gave the recipient of Farah

chali PhD fellowship and supporting fund for the research AFM-Téléthon gave supporting fund for the research

## Long-term exercise-specific neuroprotection in Spinal Muscular Atrophy-like mice

#### Running title: Exercise-specific adaptation of motor-unit in SMA

Farah Chali<sup>1</sup>, Céline Desseille<sup>1</sup>, Léo Houdebine<sup>1</sup>, Evelyne Benoit<sup>3</sup>, Thaïs Rouquet<sup>4</sup>, Bruno Bariohay<sup>4</sup>, Philippe Lopes<sup>1,2</sup>, Julien Branchu<sup>1</sup>, Bruno Della Gaspera<sup>1</sup>, Claude Pariset<sup>1</sup>, Christophe Chanoine<sup>1</sup>, Frédéric Charbonnier<sup>1</sup> and Olivier Biondi<sup>1</sup>.

1 : Université Paris Descartes and INSERM UMR\_S 1124, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France. Tel.: 33-1-4286-2153 Fax: 33-1-4286-2119.

2 : Université d'Evry-val-d'Essonne, Bd F. Mitterrand, 91000 Evry.

3 : Institut des Neurosciences Paris-Saclay, UMR 9197, CNRS, Bât. 32-33, and Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (DSV/iBiTec-S/SIMOPRO), CEA de Saclay, Bât. 152, 91190 Gif-sur-Yvette, France

4 : BIOMEOSTASIS, Nutritional behavior and metabolic disorders, FST St Jérôme, Service B52, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille.

Correspondence to Olivier Biondi:

Université Paris Descartes and INSERM UMR\_S 1124, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France. olivier.biondi@parisdescartes.fr

Tel.: 33-1-4286-2153 Fax: 33-1-4286-2119.

Key words (3): Spinal Muscular Atrophy, Exercise, Neuroprotection

#### Key points summary

- The real impact of physical exercise parameters *i.e.* intensity, type of contraction, solicited energetic metabolism; on neuroprotection in specific neurodegeneration context remain poorly explored.
- Behavioral, biochemical and cellular analysis were conducted in this study to compare the effects
  of two different long-term exercise protocols, a high intensity swimming vs low intensity running,
  on motor-unit of type 3 Spinal Muscular Atrophy (SMA)-like mouse model.
- Our data revealed a preferential SMA-induced death of intermediate and fast motor-neurons which was only limited by the swimming protocol, suggesting a close relationship between neuron-specific protection and their activation levels by specific exercise.
- The exercise-induced neuroprotection was independent of SMN protein expression and associated with specific metabolic and behavioral adaptations with notably a swimming-induced reduction of muscle fatigability.
- Our results provide new insight into motor-units adaptations to different physical exercise parameters and will contribute to the design of new active physiotherapy protocols for patient care.

## Abstract

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is a group of autosomal recessive neurodegenerative diseases differing in their clinical outcome, characterized by the specific loss of spinal motor-neurons, caused by insufficient level of SMN protein expression. No cure is presently available for SMA. While physical exercise might represent a promising approach for alleviating SMA symptoms, the lack of data dealing with the effects of different exercise types on diseased motor-units still precludes the use of active physiotherapy in SMA patients. In the present study, we have evaluated the efficiency of two long-term physical exercise paradigms, based on either high intensity swimming or on low intensity running, in alleviating SMA symptoms in a mild type 3 SMA-like mouse model. We found that a 10-month physical training induced significant benefits in terms of resistance to muscle damages, energetic metabolism, muscle fatigue and motor behavior. Both exercise types significantly enhanced motor-neuron survival, independently of SMN expression, leading to the maintenance of neuromuscular junctions and skeletal muscle phenotypes, particularly in the soleus, plantaris and tibialis of trained mice. Most importantly, both exercises significantly improved neuromuscular excitability properties. Besides, all these training-induced benefits were quantitatively and qualitatively related to the specific characteristics of each exercise, suggesting that the related neuroprotection is strongly dependent on the specific activation of some motor-neuron subpopulations. Taken together, the present data show significant long-term exercise benefits in type 3 SMA-like mice providing important clues for designing rehabilitation programs in patients.

#### Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA), the leading genetic cause of death in childhood, is a neurodegenerative disorder characterized by spinal motor-neurons degeneration, leading to progressive muscle weakness and atrophy (Russman *et al.*, 1983). No cure for SMA is presently available. Patient care is usually provided through supportive ventilation, feeding assistance and passive limbs- and thoracic-physiotherapy (Bladen *et al.*, 2014). Deletion or mutation of the telomeric copy of the *Survival-of-Motor-Neuron* gene, named *SMN1*, is responsiveness of SMA (Lefebvre *et al.*, 1995). The inverted centromeric copy of the *SMN1* gene, named *SMN2*, produces a majority of transcripts lacking the exon 7, resulting in the expression of an unstable SMN protein. *SMN2* is thus unable to fully compensate the mutation of *SMN1* (Lorson *et al.*, 1998) (Lorson & Androphy, 2000). Consequently, the number of *SMN2* copies in the genome modulates the clinical heterogeneity of the disease. Three main types of SMA are commonly distinguished according to the age of onset and the severity of motor capacity impairments (Harding & Thomas, 1980), *i.e.* the severe form type 1 SMA (Werdnig-Hoffman disease), the intermediate form type 2 SMA, and the mild form type 3 SMA (Kugelberg-Wellander disease).

Several studies have recently suggested that motor-unit maturation was severely impaired in severe type SMA-like mice, providing a tentative explanation for the motor-neuron specific sensitivity to a loss of the ubiquitously-expressed SMN protein (Biondi *et al.*, 2008; Kariya *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009). We have recently reported that a 5-day training program was sufficient to promote SMN expression in the spinal cord of severe type SMA-like mice, resulting in the improvement of the motor-unit post-natal maturation and motor-neuron survival (Grondard *et al.*, 2005; Biondi *et al.*, 2008). Taken together, these data support the hypothesis of a link between neuronal activity, motor-unit maturation, SMN expression and neuroprotection. However, no data is available in case of less severe SMA, which is characterized by a late disease onset (Tsai *et al.*, 2006), therefore raising questions about the potential role of motor-unit maturation in the SMA-induced neurodegeneration in adulthood, on the one hand, and the potential exercise-induced benefits in such a pathological context, on the other.

Moreover, the potential benefits induced by long-term physical training in case of SMA-induced late-onset and progressive neurodegeneration have never been investigated. Several investigations describing the effects of exercise in mouse models corresponding to different adulthood neurodegenerative disorders such as Parkinson disease (Tuon *et al.*, 2012; Goes *et al.*, 2014), Alzheimer disease (Liu *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013), and Amyotrophic Lateral Sclerosis (Kirkinezos *et al.*, 2003; Veldink *et al.*, 2003; Liebetanz *et al.*, 2004; Deforges *et al.*, 2009), have globally indicated beneficial effects of physical exercise, but which are related to either the intrinsic parameters of the exercise, or the nature of neuronal alterations. Indeed, physical exercise consist in different practices involving various motor, metabolic and physiological solicitations, including concentric *vs* eccentric contractions, anaerobic *vs* oxidative pathways, voluntary *vs* forced and long-term *vs* acute exercises. However the impact of these different exercise parameters has never been thoroughly investigated on diseased motor-units, lack which limits the application of active physiotherapy for neurodegenerative disorders.

In the present study, we investigated the effects of a 10-month physical training using two different exercise paradigms (Grondard *et al.*, 2008), *i.e.* a high intensity and amplitude swimming-based training and a low intensity and amplitude running-based training, in type 3 SMA-like mice (Tsai *et al.*, 2006) at the adult age. We reported compelling evidences of specific exercise-induced benefits for diseased adult motor-units, both at the structural and functional levels.

## **Methods**

#### Ethical approval

Animal handling and experimentation was performed in line with approved Institutional Animal Care and Use Committee protocols at the University of Paris Descartes and followed the national authority (Ministère de la Recherche et de la Technologie, France) guidelines for the detention, use and the ethical treatment of laboratory animals based on European Union Directive 2010/63/EU.

### Type 3 SMA-like mouse model

The knockout-transgenic type 3 SMA-like mice (FVB/NRj-*Smn*<sup> $\Delta7/\Delta7$ </sup>, *huSMN2*<sup>+/+</sup>) derived from mice obtained from the Institute of Molecular Biology (Hsieh-Li *et al.*, 2000) (Academia Sinica, Taipei, Taiwan) have been purified in the FVB/NRj genetic background (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) by backcross for more than 10 generations and were designated as "SMA" (n=68). The control mice were heterozygous knock-out for murin *Smn*, expressed homozygous human *SMN2* transgene (FVB/NRj-*Smn*<sup> $\Delta/\Delta7$ </sup>, huSMN2<sup>+/+</sup>) and were designated as "control" (n=68). Only males were selected for experimentation to standardize the analyses, and all the experiments were performed in a blind systematic manner to minimize bias. From 2 to 4 animals were housed per cages, with food and water *ad libitum*.

#### Physical training protocols and behavioral evaluation

Two months old mice were submitted either to a running-based training on a speed-regulated treadmill at 13 m.min<sup>-1</sup>, or to a swimming-based training in an adjustable-flow swimming pool at 5 l.min<sup>-1</sup> (Charbonnier and Soude, 2006, Patent FR 06 53772). Both exercises were submitted to mice 20 minutes per day and 5 days a week for

10 consecutive months. Mice were initially subjected to a preliminary 2 weeks period during which the speed of treadmill and the intensity of water flow were increased every day by 5% increment from 50% to the final speed. Sedentary Control and SMA (n=28) mice were placed in the pool without flow (14 SMA and 14 control mice) and floated at the water surface or on the treadmill without speed (14 SMA and 14 controls mice). We constituted 4 groups of trained mice, one running group of controls and one SMA (Run control and Run SMA; n=12 for each) and one swimming group of controls and one SMA (Swim control and SWA; n=12 for each).

All groups of control and SMA mice were tested at 2, 3, 6, 9, and 12 months of age for motor capabilities through 4 different tests, *i.e.* grip test for muscle resistance; grip strength for maximum muscle force; open-field for exploratory abilities; and fatigue test for the measure of time before exhaustion in swimming condition. Both 48h actimeter for spontaneous activity and fatigue test for the measure of time before exhaustion in running condition were submitted to all groups of mice at 12 months of age, only.

For the grip test, the time during which the animals were able to sustain their weight holding onto a metal rail suspended at 50 cm from table was recorded with a maximum time before testing arrest at 720 seconds. Only the maximum value of five successive trials was recorded with at least a 10 min resting period between each try.

For the grip strength test, the strength was measured using a grip tensiometer (Bioseb, Vitrolles, France) according to the TREAT-NMD guidelines. Forelimbs and four-limb traction strength tests were separately measured using a single thin metal rod and a thin metal grid, respectively, interfaced with a tensiometer. Mice gripped the metal rod with forelimbs or the metal grid with four limbs and the manipulator pulled it progressively by the tail along the instrument axis (following the manufacturer's protocol). Only the maximum value of five successive tries was retained as maximum force for each mouse, and the measurement was given in grams. The hind-limb grip strength was calculated by subtracting forelimbs from four-limb grip measurements.

For the open-field test, the mice were tested individually in a wooden box measuring 50 cm×50 cm×20 cm and divided into 25 equal squares of 10 cm. Squares adjacent to walls were referred to as periphery and the nine remaining squares were referred to as center. The open field was washed after each session. Mouse was placed in a central square on the open field and was allowed to move freely for 5 min. The number of peripheral and central square crossings was scored manually by the experimenter.

For the actimeter, both total locomotor activity and rearing behavior were recorded for each mouse during two successive days using the commercially available Physiocage system (Panlab/Harvard apparatus, Cornella, Spain) and the software suite METABOLISM (V2.2.01, Panlab). Mice were singly housed in home cages placed over a sensor platform equipped with an extensiometric weight transducer and two infra-red sensor bars including 16 IR beams spaced by 15.6 mm to allow the detection of rearing behavior. Values of locomotor activity (arbitrary

units) and rearing events were acquired by the system every second. For each animal, the total locomotor activity and the number of rearing events were calculated as the sum of the recorded values obtained for 7.5 min-, 12 h- or 24 h-interval periods.

For the fatigue tests, based either in our adjustable-flow swimming pool or in a speed-regulated treadmill, mice were subjected to the maximum sustainable water flow or treadmill speed and the time during which animals were able to maintain this maximum intensity was recorded as well as the value of speed. For swimming fatigue test, the maximum water flow was setting up at 6 l.min<sup>-1</sup> while for running fatigue test, the maximum speed of treadmill was setting up at 21 m.min<sup>-1</sup>.

## Histological and immunohistochemical analysis

Anaesthetized mice with 1% pentobarbital solution (6  $\mu$ l.g<sup>-1</sup>) were intracardially perfused with 20 ml of Phosphate buffer saline (PBS) and then with 30 ml of 4% paraformaldehyde (PFA).

For motor neuron analysis, the spinal cord was dissected, post-fixed in 4% PFA for 12h and rinsed 2 times of 24h in PBS azide 0.01% buffer. The L1 to L5 lumbar region was isolated from spinal cord, embedded in 4% agarose type 1 and cut with vibratome VT-1000S (Leica microsystems SAS, Nanterre, France) at 50-µm-thick cross sections. One out of every five sections (an average of 10 sections examined corresponding to about 200 motor-neurons (MNs) per animal, and about 1600 MNs per experimental point) was processed for immunohistochemical analysis. After 30 min at room temperature in a blocking solution (with 0.5% Tween-20, 0.5% Triton X-100 and 4% Donkey serum in Tris Buffer Solution [TBS]), tissues sections were incubated in primary goat choline acetyltransferase (ChAT) (polyclonal goat anti-ChAT; 1: 400; Chemicon, Inc., Temecula, CA, USA) and mouse Oestrogen related ERRβ (Human ERR beta/NR3A2 MAb, 1: 500, R&D systems Europe, France) antibody for 3 days at +4°C and diluted in the blocking solution. Sections were then washed between each subsequent step with 0.5% Tween-20; 0.5% Triton X-100 in TBS. Sections were subsequently incubated with secondary Alexa Fluor® 488 Donkey anti-Mouse Ig (1: 400; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) and Alexa Fluor® 568 Donkey anti-Goat Ig, (1: 400; Jackson ImmunoResearch) for 1h at room temperature. The sections were mounted in VECTASHIELD® mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The staining specificity was checked performing incubation in the absence of the primary antibody.

For motor end-plate labeling, the *soleus*, *plantaris* and *tibialis* muscles were dissected and post-fixed 12h in PFA 4%. Muscle fibers were dilacerated and stained for pre-synaptic motor nerve terminals using a mix of rabbit antibody directed against the 61 kDa isoform of neurofilament protein (NF-L; 1: 1,000; AB9568, Millipore) and rabbit anti-synaptophysin (1: 5; 80130, Life technologies) and using Alexa Fluor 568-conjugated-α-bungarotoxin (4

mg.ml<sup>-1</sup> in PBS with 4% bovine serum albumin) for post-synaptic motor nerve terminals. The dilacerated myofibers were subsequently incubated with an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1: 400; Invitrogen) to reveal the pre-synaptic staining.

For histology and typology analysis, *soleus*, *plantaris* and *tibialis* muscles were dissected from anaesthetized animals with 1% pentobarbital solution (6 μl.g<sup>-1</sup>). All muscles were frozen in cold isopentane maintained at -80°C on dry ice and cut in cryostat (Leica) at 10-µm-thick cross sections. Slices with muscle sections were either stained by histological H&E, dehydrated *via* an alcohol gradient and then mounted with Eukitt (VWR International, Strasbourg, France) or fixed with acetone and incubated with mouse antibodies raised against mouse myosin heavy chains (MyHC): embryonic (F1.652; University of Iowa, Iowa City, IA), neonatal (N3.36; University of Iowa), slow type I (NCL-MyHCs), all fast type II (NCL-MyHCf) (Leica Microsystems, France) and intermediate type IIa (A4.74) diluted at 1: 20 in 0.5% Tween 20 PBS. The secondary antibodies used were goat anti-mouse-specific antibodies conjugated with Cy3 (1: 400, Jackson ImmunoResearch). Sections were visualized as described above. For each mouse, three sections of each muscle were studied. The percentage of fast IIx and IIb fibres were determined as the difference between the total number of type II and type IIa fibres.

All counts were performed using ImageJ software v1.47 (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Color images were tinted using ImageJ software v1.47, where identical brightness, contrast, and color balance adjustments were applied to all groups.

### In situ hybridization

Floating lumbar spinal cords sections were dehydrated in a graded series of methanol washes before storage in 100% methanol in -20°C. Sections were rehydrated by successive washes in methanol and 0.1% Tween-20 PBS (PBT) ending up in 100% PBT. Sections were treated with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). After additional washes in PBT, sections were digested with 20 µg.ml<sup>-1</sup> proteinase K (Invitrogen). The reaction was stopped by washing in a large volume of PBT. The sections were then postfixed in 4% formaldehyde before preincubation in hybridization buffer (50% formamide, 5X SSC, pH 4.5, 1% sodium dodecyl sulphate [SDS], 50 µg.ml<sup>-1</sup> tRNA (Sigma-Aldrich), 50 µg.ml<sup>-1</sup> heparin (Sigma-Aldrich) in PBT). Then, chondrolectin (Chodl) probe, as previously described (Enjin *et al.*, 2010)(1914-2530, NM\_0139134.3), at 300 ng.ml<sup>-1</sup> was heat-denatured in hybridization buffer. Hybridization was performed overnight (14–16 h) at +65°C. Unbound probe was removed by sequential washes of buffer 1 (50% formamide, 5X SSC, pH 4.,5 and 1% SDS in PBT) followed by buffer 2 (50% formamide, 2X SSC, pH 4.5, and PBT) at +65°C. The sections were further washed in 0.1% Tween-20 TBS (TBST) before incubation in 1% blocking reagent (Roche Diagnostics Scandinavia, Stockholm, Sweden) together with 1: 5,000 diluted anti-digoxigenin alkaline phosphatase-conjugated antibody (Roche Diagnostics Scandinavia) overnight in +4°C. Unbound antibody was removed by sequential washes with 2 mM levamisole (GTF Fisher, Stockholm, Sweden) in TBST followed by washes with 2 mM levamisole in NTMT (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl2, and 0.1% Tween-20). Sections were developed in BM purple AP substrate (Roche Diagnostics Scandinavia).

#### Microscopy

All immunofluorescence images were collected with a CMOS camera (ORCA Flash 2.8, Hamamatsu Photonics France, Massy, France) mounted on Zeiss AxioObserver (Z1, Carl Zeiss SAS, Le Pecq, France) using the ZEN 2012 software (Carl Zeiss SAS) with 100 (10X Zeiss Plan NeoFluar NA 0.3), 200 (20X Zeiss EC-Plan-Apo NA 0.8) and 630 (63X Zeiss Plan-Apo Oil N 1.4) magnifications.

#### Serum lactate and creatine kinase measurements

Mice were anesthetized with 1% pentobarbital solution (6  $\mu$ l.g<sup>-1</sup>) diluted in 0.9% saline buffer by intraperitoneal injection. A 800  $\mu$ l blood sample was taken from the right ventricle with a 1 ml syringe mounted with a 22-gauge needle, both coated with heparin (5000 UI.ml<sup>-1</sup>, Pan Pharma Luitré, France). The blood sample was centrifuged at 1500 g for 10 min at +4°C. Obtained serum was then frozen, stored at -80°C, and used within 1 month. Serum creatine kinase (CK) activity were quantified in duplicate using EnzyChrom CK Assay Kit (ECPK-100; BioAssay Systems, Hayward, CA). For each point, a 10  $\mu$ l sample of serum was incubated at 22°C in 100  $\mu$ l of reactive buffer following the manufacturer's protocol in a 96-well plate. The plate was read on a microplate spectrometer (SpectraMax 340PC384; Molecular Devices, St. Grégoire, France) at 340 nm wavelength after 20 and 40 min of incubation. CK activity were evaluated following the manufacturer's protocol and given in units per liter (U.l<sup>-1</sup>). Lactate levels were quantified in duplicate using lactate assay kit (K607-100; BioVision, Milpitas, CA). For each point, 2  $\mu$ l samples of serum were incubated at 22°C in 50  $\mu$ l of buffer and 50  $\mu$ l of reaction mix following the manufacturer's protocol in a 96-well plate. The plate was read on the same microplate spectrometer at 570 nm wavelength after 30 min of incubation. Lactate level was given in nanomoles per microliter (nmol. $\mu$ l<sup>-1</sup>).

#### Protein and western blot analysis

The ventral part of frozen spinal cords were selectively dissected by razor blade at -20°C. A furrow still appeared in the middle of the ventral part and dorsal root ganglia were visible on the dorsal part of the spinal cord. Ventral lumbar spinal cord samples (4 to 10 mg) were homogenized in 100  $\mu$ l per 5 mg tissues in the presence of

ice-cold RIPA buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.1%SDS, 1% NP40, 10mM NAF, 1x Protease inhibitor [Roche, BASEL, Suisse], 1% Phosphatase inhibitor [Sigma-aldrich, Saint-Louis, MO, USA]). Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 min, 17,000 *g*) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Biorad Laboratories, CA). Protein samples (40 μg) were submitted to 12.5% SDS-PAGE electrophoresis (1.5 M Tris pH 8.3, 12.5% Acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.06% TEMED). The separated proteins were transferred on PVDF membranes (Biorad Laboratories, CA) according to Towbin protocol (Towbin *et al.*, 1984). Equal loading of samples was checked by Ponceau dye staining of the transferred gels. Western blot analysis was performed on membranes overnight at 4°C in 4% BSA, 0.05% Tween 20, TBS pH 7.4. The primary antibody monoclonal mouse anti-SMN (1: 5.000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) was incubated overnight at +4°C in the above blocking medium. Membranes were rinsed in 0.1% Tween 20 in TBS for 3 x 10 min at room temperature and then incubated in horseradish peroxydase-conjugated Goat secondary antibody directed against Mouse Immunoglobulins (1: 5.000; Biorad Laboratories, CA) in 0.1 % Tween 20 in TBS for 1 h at room temperature. Bound antibody complexes were developed using the ECL system (Amersham Biotech., Saclay, France) and exposed to hyperfilm ECL-plus X ray film (Amersham Biotech.). Films were quantified with ImageJ v1.47.

### Electrophysiological recordings from the mouse neuromuscular system in vivo

The multimodal evaluation of excitability properties of the neuromuscular system of controls and SMA mice were assessed, *in vivo*, by means of a minimally-invasive electrophysiological method, using the Qtrac<sup>©</sup> software written by Prof. Hugh Bostock (Institute of Neurology, London, UK), as detailed previously (Boerio *et al.*, 2009). Mice anesthetization was performed by inhalation of 1.5% of isoflurane (AErrane<sup>®</sup>, Baxter S.A., Lessines, Belgium) in air, and the experimental protocol has been approved by the French Departmental Direction of Animal Protection (n° A91-453 to E.B.).

Briefly, an anesthetized given mouse was placed on a heating pad to maintain body temperature between 35.4 and 35.6°C (measured using a rectal probe). Electrical stimulations were delivered to the tibial branch of sciatic motor nerve, by means of surface electrodes, and the compound muscle action potential (CMAP) was recorded using needle electrodes inserted into the plantar muscle. The mouse was submitted to one session of excitability measurements (TRONDE protocol) which consisted in five different tests (stimulus-response, strength-duration and current-threshold relationships, as well as threshold electrotonus and recovery cycle) performed together. Overall, more than thirty parameters were determined from these tests, and analyzed. It is worth noting that each specific excitability test provides additional and complementary information regarding the functional status of ion channels

and electrogenic pumps, as well as membrane properties of the neuromuscular system (Kiernan *et al.*, 2000; Krishnan *et al.*, 2008).

#### Statistical analysis

All data are expressed as means and standard deviation ( $\pm$  SD) of *n* different mice for each group. For the longitudinal behavioral studies, a two-way ANOVA for repeated measures with Tukey post-hoc analysis was performed to compare all groups of mice and all ages (Systat v 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL). For other endpoint studies, a Kolmogorov-Smirnov normal distribution analysis was performed on all data followed by either a student's t-test for normally distributed data or a non-parametric Mann-Whitney U-test, to verify significant differences between groups (Systat v 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Statistical significance was considered when statistical power exceeds 95% ( $p \le 0.05$ ; AnaStats.fr, France).

### Results

#### Muscle resistance is improved by long-term physical training in type3 SMA-like mice

We submitted a population of controls and type 3 SMA-like mice to either a running- or a swimmingprotocol for 10 months, as previously described (Grondard *et al.*, 2008). To better characterize each exercise and to define their effects in an SMA context, we investigated the creatine kinase (CK) activity and lactate levels (indicators of potential exercise-induced muscle lesions and energetic pathway used, respectively) in the serum of trained controls and type 3 SMA-like mice in comparison to sedentary counterparts, at 2 and 12 months of age.

In control mice, we found that, in contrast to swimming, a single bout of running exercise induced a significant increase in CK activity at 2 and 12 months of age (Fig. 1*A-C*). Conversely, in contrast to running, a single bout of swimming exercise induced a 2-fold increase in serum lactate levels at 2 and 12 months of age (Fig. 1*B*). These data suggested that only the running-based exercise induced muscle damages and that the swimming-based exercise solicited more the anaerobic pathway than the running-based training, as previously reported [17].

In SMA mice, if no alteration of the CK activity was detected at 2 and 12 months of age when compared to control mice, the circulating lactate concentration levels were 2 fold higher at both ages in sedentary SMA mice (Fig. 1*A* and *B*). After a bout of exercise, independently of its type, we observed an elevation of both CK activity and lactate concentration compared to sedentary SMA mice at 2 (Fig. 1*A* and *B*) and 12 months of age (data not shown). Interestingly, in type 3 SMA-like mice and after 10 months of training, serum CK activity and lactate level response to exercise bout returned back to controls response (Fig. 1*C* and *D*). These data suggested that a 10-month

training program in type 3 SMA-like mice led to 1) improved muscle resistance to activity-induced damages and 2) increased aerobic performance.

Long-term physical training significantly improves type 3 SMA-like mice motor behavior in a type-specific manner

We next investigated the impact of both physical exercises on type 3 SMA-like mice motor function, including motor behavior and strength in the fore- and hind-limbs, in comparison to age-matched controls, from 2 months to 12 months of age.

The grip strength test results indicated a significant decrease in maximal force from 6 months of age in the fore-limbs and from 9 months of age in hind-limbs of sedentary type 3 SMA-like mice (Fig. 2*A*). Both exercise type enhanced muscular strength in type 3 SMA-like mice reaching values comparable to sedentary controls throughout the ages spans (Fig. 2*A*).

We then measured the muscular fatigability to low-intensity effort (20% of maximum force) during a grip test. The resistance to fatigue for both control and type 3 SMA-like mice increased significantly between 2 and 3 months of age, from 20 to 160 seconds. However, SMA-like mice showed progressive decrease in their resistance to fatigue until 140 seconds, while control mice showed a significant increase reaching a plateau around 250 seconds at 9 months old (Fig. 2*B*). Interestingly, whatever the physical exercise, a significantly reduction of muscle fatigability in response to low intensity effort was recorded in type 3 SMA-like mice, albeit with more efficiency after the swimming-protocol, with scores reaching 720 seconds at 6 months of age (Fig. 2*B*).

When we submitted mice to the high intensity swimming fatigue test, we found a significantly higher fatigability in type 3 SMA-like mice when compared to controls, with a decrease in the time to exhaustion from 3 months of age and in the sustained maximum water flow from 6 months of age, reaching 83 seconds and 3  $1.min^{-1}$  against 200 seconds and 6  $1.min^{-1}$  respectively (Fig. 2C). Both exercises significantly reduced fatigability in response to high intensity effort in type 3 SMA-like mice, with the strongest effect obtained with swimming-protocol (Fig. 2*C*). These results were also confirmed in the high intensity running fatigue test at 12 months of age (Fig. 2*D*).

Finally, no significant differences were observed from 2 to 12 months of age in an open field test between all groups of mice (Fig. 2*E*). This result was confirmed at 12 months of age with the 48h spontaneous activity (Fig 2F). However, a significant decrease in the number of vertical rearing were found in type 3 SMA-like compared to control mice at 12 months of age (Fig. 2*G*), which was improved by both exercise protocols in type 3 SMA-like mice with a complete restoration obtained with the swimming-protocol (Fig 2*G*). Taken together, these behavioral

data suggested that both types of long-term physical training were beneficial in terms of resistance to fatigue and motor behavior in type 3 SMA-like mice, albeit with different efficiency, swimming leading to higher effects than running.

#### Specific exercise differentially protects motor-neuron subpopulations in type 3 SMA-like mice

In order to get specific exercise insight into the cellular mechanisms underlying the beneficial effects of physical training on the motor behavior in type 3 SMA-like mice, we analyzed the motor-neuron populations by counting the residual number of ChAT-positive neurons in the ventral horn of the L1-L5 lumbar spinal cord in sedentary and trained control and type 3 SMA-like mice at 12 months of age. The total number of motor neurons showed a marked decrease in the lumbar spinal cord of type 3 SMA-like mice, with a 45% loss of ChAT-positive neurons when compared to control mice (Fig. 3*A* and *B*). Both exercise protocols significantly decreased motor-neuron loss when compared to controls with the strongest efficiency observed with the swimming program, reducing by half the SMA-induced motor neuron loss (Fig. 3*A* and *B*).

To better characterize the neuroprotective effects of each exercise program, we then analyzed the different spinal motor-neuron sub-populations, based on 1) their localization in the spinal cord (medial *vs* lateral), 2) their soma size distribution (large *vs* small area), and 3) their type (fast *vs* slow).

Two different pools of motor-neurons could be distinguished on the basis of their cell body localization within the ventral spinal cord, those that have their cell body in the medial region of the ventral spinal cord are thought to specifically innervate proximal and axial muscles and those that have their cell body localized more laterally are thought to specifically innervate distal muscles (Bacskai *et al.*, 2014). In the spinal cord of the sedentary type 3 SMA-like mice, we observed a drastic 6-fold decrease in the number of medial motor-neurons, known to specifically innervate growing [27], whereas this decrease was reduced to only 37% for lateral motor-neurons, known to specifically innervate distal muscles [27] (Fig. 3*B*). Both exercise protocols efficiently limited medial motor-neurons loss although swimming clearly provided more pronounced effects than running (Fig. 3*B*).

We next analyzed the different sub-population of motor-neurons based on their soma size distribution. In sedentary type 3 SMA-like mice, and as mean for 10 slices from L1 to L5 lumbar spinal cord, we observed a significant decrease in the absolute number of large (area greater than 600  $\mu$ m<sup>2</sup>) and intermediate-area motorneurons (area ranged between 300 and 600  $\mu$ m<sup>2</sup>) in comparison to sedentary controls, (48 in type 3 SMA-like mice *vs* 96 in controls mice and 52 in type 3 SMA-like mice *vs* 101 in controls mice, respectively), while the absolute number of small-area motor-neurons proportion (less than 300  $\mu$ m<sup>2</sup>) remained stable at around 14 (Fig. 3*C*). Consequently, we noted a switch in the proportion of residual motor-neurons from large to small in type 3 SMA-like mice when compared to controls, unexpectedly suggesting a motor-neuron type dependent degeneration in type 3 SMA-like mice (Fig. 3*D*). Both exercise protocols significantly reduced the loss of intermediate- and large-area motor-neurons, with the best effects recorded for large motor-neurons after the swimming program (Fig. 3*C* and *D*).

We finally evaluated the impact of each training program on motor-neuron survival depending on their type *i.e.* fast or slow. Since fast motor neurons are shown to express chondrolectin (Chodl) and slow motor-neurons Oestrogen-related receptor  $\beta$  (ERR $\beta$ ) [23], we performed either *in-situ* hybridization for *Chodl* mRNA or immunolocalization of ERR $\beta$  in ChAT-positive cells in ventral horn of the lumbar L1-L5 spinal cord (Fig. 3*E*-*H*). As expected, we found that all *Chodl*-positive cells exhibited large soma surface, up to 600 µm2, while all of ERR $\beta$ -ChAT-positive neurons exhibited soma surface less than 600 µm2 (Data not shown). In sedentary type 3 SMA-like mice, the number of Chodl-positive neurons (Fig. 3*E*) and ERR $\beta$ -positive motor-neurons (Fig. 3*G*) were 50% and 2 fold lower, respectively, compared to sedentary controls (Fig. 3*F* and *H*). Very interestingly, the swimming-based training significantly reduced the loss of *Chodl*-positive motor-neurons reaching levels comparable to controls, but failed to protect ERR $\beta$  motor-neurons (Fig. 3*E*-*H*). Conversely, we found a significant running-induced neuroprotection of the ERR $\beta$ -positives motor-neurons but no significant effects on *Chodl*-positive neurons in type 3 SMA-like mice (Fig. 3*E*-*H*).

Finally, to determine whether these exercise-induced neuroprotection could be linked to a modification in SMN protein expression, we performed western-blots on full-length SMN protein in the ventral lumbar L1-L5 spinal cord of sedentary and trained controls and type 3 SMA-like mice at 12 month of age. We found a 2-fold decrease in SMN protein expression in type 3 SMA-like mice when compared to controls (Fig. 3*I* and *J*). Both physical training programs were unable to induce SMN expression in the spinal cord, suggesting an SMN-independent exercise-induced benefits.

### Long-term physical training protects neuromuscular junction structure in type 3 SMA-like mice

We next analyzed the shape of the neuromuscular junction (NMJ) for innervated NMJ using  $\alpha$ -bungarotoxin staining and neurofilament+synaptophysin immunostaining, as previously described (Biondi *et al.*, 2008), in three different muscles of the calf, the extensor slow-twitch *soleus*, the extensor fast-twitch *plantaris* and the flexor fast-twitch *tibialis*, in controls and type 3 SMA-like mice. In adulthood, this pretzel shape organization could be pathologically affected according two main parameters: gutter fragmentation and total area alterations (Falk *et al.*, 2014).

At 12 months of age, a significant increase in fragmented NMJs was only recorded in the two extensor *soleus* and *plantaris* muscles of sedentary type 3 SMA-like mice compared to control mice (Fig. 4A and B). Interestingly, both exercise protocols were able to significantly reduce SMA-induced NMJ's fragmentation, with a complete or a partial decrease in the *plantaris* and the *soleus* muscles, respectively, when compared to controls.

Concerning the total gutter area at 12 months of age, the *plantaris* NMJs only appeared significantly affected by the disease with a significant increase in the proportion of small and intermediate *plantaris* NMJ area, associated with a decrease in the proportion of large *plantaris* NMJ area in type 3 SMA-like mice compared to controls (Fig. 4*C*). Both exercise protocols reduced the SMA-induced decrease in NMJ area, albeit slightly. In addition, only the running exercise induced an enlargement of the NMJ area in the *soleus* muscle (Fig. 4*C*).

Specific exercise differentially limited muscle atrophy and fast-to-slow myofiber transitions in type 3 SMA-like mice

Based on previous studies that have dealt with SMA-induced muscle alterations in diverse mouse models [7,8,29,30], we analyzed muscles alterations, in *soleus, plantaris* and *tibialis* of controls and type 3 SMA-like mice at 12 months of age. As evidenced on haematoxylin-eosin stained muscles, exercise significantly reduced the atrophy in SMA muscles (Fig. 5*A-D*). More precisely, the running exercise preferentially induced hypertrophy of intermediate-area myofibers for both extensor muscles and of large-area myofibers for the flexor *tibialis*, whereas the swimming exercise preferentially induced hypertrophy of the largest myofibers in three analyzed muscles (Fig. 5*B-D*).

Concerning the muscle typology, we next determined the percentage of myofibers expressing slow (type I), intermediate (type IIa) or fast (IIx+IIb) myosin heavy chain isoforms, as previously described [8,31]. At 12 months of age, we noted a transition to a slowest phenotype in the 3 SMA muscles compared to controls, as revealed by a gain in type I fibers for the *soleus* muscle and in type IIa fibers for the two fast-twitch muscles, the two extensors being more affected than the flexor muscles in type 3 SMA-like mice (Fig. 5*E* and *F*). The swimming exercise reduced SMA-induced myofiber transitions in type 3 SMA-like mice (Fig. 5*F*), restoring type I proportion and favoring intermediate and fast-twitch myofibers (Fig. 5*F*). In contrast, the running-based training led to a gain in type I myofibers compared to sedentary SMA-like mice (Fig. 5*F*).

Long-term physical training significantly improved alterations of neuromuscular excitability in type 3 SMA-like mice

To ascertain that the exercise-induced protection of the motor-unit structure resulted in retained functional properties, we evaluated *in vivo*, the neuromuscular excitability properties of hind-limb plantar muscle in all groups of mice. Profound significant alterations of neuromuscular excitability waveforms (Fig. 6) and associated parameters (Table 1) were detected in 12 month-old sedentary type 3 SMA-like mice when compared to controls. These alterations consisted in (1) an increased latency between the nerve stimulation onset and the Compound Muscle Action Potential (CMAP) peak amplitude (Stimulus-response relationship), (2) a decreased chronaxie and, increased rheobase (Strength-duration relationship), (3) higher and longer refractory periods (Recovery cycle), (4) a reduced hyperpolarizing slope associated with an increase in the resting slope (current-threshold relationship), and (5) smaller threshold changes with both depolarizing and hyperpolarizing prolonged subthreshold currents.

Importantly, all these alterations were significantly reduced by both exercise protocols in type 3 SMA-like mice. Hence, neuromuscular excitability waveforms (Fig. 6) and parameters (Table 1) of 12 month-old running and swimming type 3 SMA-like mice were comparable to those of age-matched control animals.

## Discussion

Admittedly, submitting SMA patients to an exercise program may be considered hazardous due to motor weakness, muscular fatigue of patients and lack of studies investigating physical training effects in SMA (Preisler *et al.*, 2009; Lewelt *et al.*, 2015). The present study provides the first lines of evidence indicating that long-term exercise could be beneficial for mild SMA, improving motor performances and reducing muscle fatigability in a type 3 SMA-like mouse model. These benefits were linked to a significant exercise-specific neuroprotection of lumbar motor neurons (MNs). While the exercise protocols used were based on different velocity, amplitude of movement, energetic metabolic involvement and motor unit recruitment (Grondard *et al.*, 2008), they both resulted in significant benefits for SMA-like mice, albeit with exercise-related specificities. In addition, the present study strongly suggests that the forced and repetitive use of motor-units sufficiently protects them from SMA-induced alterations, independently of the SMN gene expression.

Importantly, both exercises protocols efficiently protected the sub-population of MNs that have been shown particularly sensitive to SMA (Mentis *et al.*, 2011). In type 3 SMA-like mice, the main part of the medial MN population, innervating the proximal and axial muscles, has disappeared similarly to severe SMA mouse model (Mentis *et al.*, 2011), while the lateral MNs, innervating distal muscles, remained present at 62%. Whatever the cause of the preferential loss of medial MNs, a significant protection was shown with both exercise paradigms, with the highest efficiency obtained with swimming exercise. This swimming efficiency could be explained by the higher solicitation of proximal muscles to maintain the body afloat compared to running. This hypothesis, linking the levels
of activation of a specific motor-unit to the efficiency of its MN protection, is further evidenced by the preferential neuroprotection of MN subpopulations by specific exercise. Yet, the running exercise, described as a low intensity and amplitude exercise, is expected to recruit preferentially the slow and intermediate motor-units (Grondard *et al.*, 2008) and we showed that this type of exercise protected essentially small cell body ERR $\beta$ + MNs, referred to as slow MNs (Enjin *et al.*, 2010). In contrast, the swimming exercise, described as a high intensity and amplitude exercise, is expected to recruit intermediate and fast motor-units (Grondard *et al.*, 2008) and we showed that this type of exercise protected preferentially the slow and intermediate as a high intensity and amplitude exercise, is expected to recruit intermediate and fast motor-units (Grondard *et al.*, 2008) and we showed that this type of exercise protected preferentially large cell body *Chodl*+ MNs, referred to as fast MNs (Enjin *et al.*, 2010).

The fact that the exercise-induced neuroprotection in type 3 SMA-like mice occurred independently of SMN protein expression is puzzling and unexpected when compared with the effects of a 5-day training program performed in type 2 SMA-like mice (Grondard *et al.*, 2005). In contrast to the former study (Grondard *et al.*, 2005), performed in immature 8-days-old mice (Biondi *et al.*, 2008), the present study used an adult type 3 SMA mouse model characterized by low expression levels of SMN compared to more precocious ages. Undoubtedly, the molecular mechanisms underlying the beneficial effects of exercise in each case would be specifically linked to the structure of responding system. Furthermore, several compounds such as ROCK inhibitors (Bowerman *et al.*, 2010) or the HDAC-inhibitor Trichostatin A (Liu *et al.*, 2014) were also shown to significantly improve the motor behaviour and motor-unit state of an intermediate SMA-like mouse model independently of SMN expression.

In addition to its potential in protecting SMA MNs, both exercise protocols improved the neuromuscular excitability properties. Several specific perturbations of the neuromuscular functions have already been reported in SMA, including 1) a Compound Muscle Action Potential (CMAP) decrease (Kissel *et al.*, 2011), 2) motor-neuron hyper-excitability (Mentis *et al.*, 2011) and 3) an increase in latency (Yonekawa *et al.*, 2013). However, we described here for the first time that the smaller threshold changes found in sedentary type 3 SMA-like mice in comparison to controls strongly suggest motor-neuron membrane depolarization through increased excitability of the SMA neuromuscular system (Kiernan & Bostock, 2000; Kiernan *et al.*, 2002). Furthermore, these alterations are consistent with a dysfunction of either Na+ and K+ channels along motor-neuron axons or the oxygen-dependent Na/K-ATPase (Kiernan & Bostock, 2000). Therefore, their improvement after physical training would result in either compensatory hyperactivity of the Na/K-ATPase or a recovery of ions channels functionality, leading to membrane hyperpolarization.

Taken together, our results support the concept of a double adaptive effect in type 3 SMA-like mice, implying an intrinsic muscle adaptation on one hand and an exercise-induced specific neuroprotection on the other. Indeed, the running exercise induced a transition from type II to type I myofibres in the context of preferential neuroprotection of slow motor-neurons, which could be attributable to exercise-induced neuroprotection, but also an

hypertrophy of intermediate fibres or large fibres, which could be attributable to intrinsic muscle adaptations. The swimming exercise induced a transition from type IIx/IIb to type IIa myofibres in both fast-twitch muscles with an hypertrophy of large fibres, which could be attributable to intrinsic muscle adaptations, in a context of maintenance of IIx/IIb myofibres, likely attributable to the neuroprotection of fast motor-neurons.

Furthermore, based on structural (NMJ and myofibers phenotypes) and on behavioral data (Vertical rearing events), we confirmed in type 3 SMA-like mice the preferential alteration of extensor muscles (Biondi *et al.*, 2008). In both exercise types, the extensors muscles are solicited, notably during the pushing phase of the movement (Gruner *et al.*, 1980). The fact that these muscles were significantly improved by both exercise further substantiated the hypothesis of a direct link between activity and neuroprotection leading to beneficial motor-unit adaptations.

Most importantly, the present study provides several clues that could be crucial when designing rehabilitation protocols for mild SMA patients. The swimming-based training clearly provided the most profound benefits in terms of neuroprotection, muscle phenotype maintenance and motor behavior, including a significant increase in muscle resistance to fatigue. Therefore, short periods of high intensity swimming exercises essentially targeting the recruitment of extensors muscles should be clinically relevant for mild SMA patient's care.

## References

- Bacskai T, Rusznak Z, Paxinos G & Watson C. (2014). Musculotopic organization of the motor neurons supplying the mouse hindlimb muscles: a quantitative study using Fluoro-Gold retrograde tracing. *Brain structure & function* **219**, 303-321.
- Biondi O, Grondard C, Lecolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C & Charbonnier F. (2008). Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 28, 953-962.
- Bladen CL, Thompson R, Jackson JM, Garland C, Wegel C, Ambrosini A, Pisano P, Walter MC, Schreiber O, Lusakowska A, Jedrzejowska M, Kostera-Pruszczyk A, van der Pol L, Wadman RI, Gredal O, Karaduman A, Topaloglu H, Yilmaz O, Matyushenko V, Rasic VM, Kosac A, Karcagi V, Garami M, Herczegfalvi A, Monges S, Moresco A, Chertkoff L, Chamova T, Guergueltcheva V, Butoianu N, Craiu D, Korngut L, Campbell C, Haberlova J, Strenkova J, Alejandro M, Jimenez A, Ortiz GG, Enriquez GV, Rodrigues M, Roxburgh R, Dawkins H, Youngs L, Lahdetie J, Angelkova N, Saugier-Veber P, Cuisset JM, Bloetzer C, Jeannet PY, Klein A, Nascimento A, Tizzano E, Salgado D, Mercuri E, Sejersen T, Kirschner J, Rafferty K, Straub V, Bushby K, Verschuuren J, Beroud C & Lochmuller H. (2014). Mapping the differences in care for 5,000 spinal muscular atrophy patients, a survey of 24 national registries in North America, Australasia and Europe. *J Neurol* 261, 152-163.
- Boerio D, Greensmith L & Bostock H. (2009). Excitability properties of motor axons in the maturing mouse. J Peripher Nerv Syst 14, 45-53.
- Bowerman M, Beauvais A, Anderson CL & Kothary R. (2010). Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model. *Hum Mol Genet* **19**, 1468-1478.

- Deforges S, Branchu J, Biondi O, Grondard C, Pariset C, Lecolle S, Lopes P, Vidal PP, Chanoine C & Charbonnier F. (2009). Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* **587**, 3561-3572.
- Enjin A, Rabe N, Nakanishi ST, Vallstedt A, Gezelius H, Memic F, Lind M, Hjalt T, Tourtellotte WG, Bruder C, Eichele G, Whelan PJ & Kullander K. (2010). Identification of novel spinal cholinergic genetic subtypes disclose Chodl and Pitx2 as markers for fast motor neurons and partition cells. J Comp Neurol 518, 2284-2304.
- Falk DJ, Todd AG, Lee S, Soustek MS, ElMallah MK, Fuller DD, Notterpek L & Byrne BJ. (2014). Peripheral nerve and neuromuscular junction pathology in Pompe disease. *Hum Mol Genet*.
- Goes AT, Souza LC, Filho CB, Del Fabbro L, De Gomes MG, Boeira SP & Jesse CR. (2014). Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* **256**, 61-71.
- Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lecolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C & Charbonnier F. (2005). Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 25, 7615-7622.
- Grondard C, Biondi O, Pariset C, Lopes P, Deforges S, Lecolle S, Gaspera BD, Gallien CL, Chanoine C
   & Charbonnier F. (2008). Exercise-induced modulation of calcineurin activity parallels the time course of myofibre transitions. *J Cell Physiol* 214, 126-135.
- Gruner JA, Altman J & Spivack N. (1980). Effects of arrested cerebellar development on locomotion in the rat. Cinematographic and electromyographic analysis. *Exp Brain Res* **40**, 361-373.
- Harding AE & Thomas PK. (1980). The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* **103**, 259-280.
- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH & Li H. (2000). A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* **24**, 66-70.
- Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT & Monani UR. (2008). Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*.
- Kiernan MC & Bostock H. (2000). Effects of membrane polarization and ischaemia on the excitability properties of human motor axons. *Brain* **123** Pt **12**, 2542-2551.
- Kiernan MC, Burke D, Andersen KV & Bostock H. (2000). Multiple measures of axonal excitability: a new approach in clinical testing. *Muscle Nerve* 23, 399-409.
- Kiernan MC, Walters RJ, Andersen KV, Taube D, Murray NM & Bostock H. (2002). Nerve excitability changes in chronic renal failure indicate membrane depolarization due to hyperkalaemia. *Brain* 125, 1366-1378.
- Kirkinezos IG, Hernandez D, Bradley WG & Moraes CT. (2003). Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **53**, 804-807.
- Kissel JT, Scott CB, Reyna SP, Crawford TO, Simard LR, Krosschell KJ, Acsadi G, Elsheik B, Schroth MK, D'Anjou G, LaSalle B, Prior TW, Sorenson S, Maczulski JA, Bromberg MB, Chan GM & Swoboda KJ. (2011). SMA CARNIVAL TRIAL PART II: a prospective, single-armed trial of Lcarnitine and valproic acid in ambulatory children with spinal muscular atrophy. *PLoS One* 6, e21296.

- Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marce M, Griffin JW, Rich MM & Sumner CJ. (2009). Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. J Neurosci 29, 842-851.
- Krishnan AV, Bostock H, Ip J, Hayes M, Watson S & Kiernan MC. (2008). Axonal function in a family with episodic ataxia type 2 due to a novel mutation. *J Neurol* **255**, 750-755.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M & et al. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophydetermining gene. *Cell* 80, 155-165.
- Lewelt A, Krosschell KJ, Stoddard GJ, Weng C, Xue M, Marcus RL, Gappmaier E, Viollet L, Johnson BA, White AT, Viazzo-Trussell D, Lopes P, Lane RH, Carey JC & Swoboda KJ. (2015). Resistance Strength Training Exercise in Children with Spinal Muscular Atrophy. *Muscle Nerve*.
- Liebetanz D, Hagemann K, von Lewinski F, Kahler E & Paulus W. (2004). Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* **20**, 3115-3120.
- Liu H, Yazdani A, Murray LM, Beauvais A & Kothary R. (2014). The Smn-independent beneficial effects of trichostatin A on an intermediate mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS One* **9**, e101225.
- Liu HL, Zhao G, Zhang H & Shi LD. (2013). Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *Behavioural brain research* **256**, 261-272.
- Lorson CL & Androphy EJ. (2000). An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* **9**, 259-265.
- Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH & Androphy EJ. (1998). SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 19, 63-66.
- Mentis GZ, Blivis D, Liu W, Drobac E, Crowder ME, Kong L, Alvarez FJ, Sumner CJ & O'Donovan MJ. (2011). Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neuron* 69, 453-467.
- Preisler N, Andersen G, Thogersen F, Crone C, Jeppesen TD, Wibrand F & Vissing J. (2009). Effect of aerobic training in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy disease). *Neurology* 72, 317-323.
- Russman BS, Melchreit R & Drennan JC. (1983). Spinal muscular atrophy: the natural course of disease. *Muscle Nerve* **6**, 179-181.
- Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG & Rosenfelder G. (1984). Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J Immunol Methods* **72**, 471-479.
- Tsai LK, Tsai MS, Lin TB, Hwu WL & Li H. (2006). Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 24, 286-295.
- Tuon T, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Luciano T, Trom CB, Silva LA, Quevedo J, Souza CT, Lira FS & Pinho RA. (2012). Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 227, 305-312.

- Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH & van den Berg LH. (2003). Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord* 13, 737-743.
- Xu ZQ, Zhang LQ, Wang Q, Marshall C, Xiao N, Gao JY, Wu T, Ding J, Hu G & Xiao M. (2013). Aerobic exercise combined with antioxidative treatment does not counteract moderate- or midstage Alzheimer-like pathophysiology of APP/PS1 mice. CNS neuroscience & therapeutics 19, 795-803.
- Yonekawa T, Komaki H, Saito Y, Sugai K & Sasaki M. (2013). Peripheral nerve abnormalities in pediatric patients with spinal muscular atrophy. *Brain Dev* **35**, 165-171.

## **Competing interests**

The authors declare no competing financial interest. Patent on active physiotherapy for SMA patients is pending.

#### Author contributions

F.Chali conducted and analyzed the majority of experiments. C.D and L.H conducted the western blot experiments and participated to behavioral testing experiments. E.B. conducted and analyzed the electrophysiological experiments on neuromuscular excitability. T.R and B.B. conducted and analyzed the spontaneous activity and vertical rearing experiments. B.D.G. conducted the *in situ* hybridization experiments. J.B. conducted NMJs experiments and developmental analysis of NMJ and muscle. P.L. conducted the behavior analysis and helped in writing the manuscript. C.P. assisted in the majority of experiments and helped in writing the analysis of muscle data. F.C. helped in supervising the project and experiments and helped in writing the manuscript. O.B. supervised the project and wrote the manuscript.

## Funding

F.Chali is the recipient of a PhD fellowship from the AXA Research fund and "Fondation Garches". This work is supported by AFM ("Association Française contre les Myopathies").

## Acknowledgments

All the authors wish to thank C. Mader and J. Coppet for animal care and Klas Kullander and its laboratory for delivery of *in situ* hybridization probes.

Curve	Der	rived excitability parameter <sup>2</sup>	Sedentary	Sedentary	Run SMA	Swim SMA	
C1	06	Peak response (mV)	$\frac{\text{Control}}{52 \pm 12}$	$44 \pm 121$	5+12	46+12	
C1	19	Latency (ms)	$2.9 \pm 0.08$	33+01	3 = 1.2 $3 \pm 0.1$	$29 \pm 0.2$	
C1	01	Stimulus $(mA)$ for 50% may	$2.9 \pm 0.00$	$0.2 \pm 1.1$	$0.2 \pm 1$	$2.7 \pm 0.2$	
CI	01.	response	$0.2 \pm 1.08$	$0.2 \pm 1.1$	$0.2 \pm 1$	$0.27 \pm 1.2$	
C1	05.	Stimulus-response slope	$4.4 \pm 1.17$	$3.7 \pm 1.1$	4.9 ± 1.2	$4.3 \pm 1.2$	
C2	03.	Strength-duration time	$0.7 \pm 0.05$	$0.5 \pm 0.04$	$0.7 \pm 0.04$	$0.6 \pm 0.02$	
		constant (ms)					
C2	04.	Rheobase (mA)	$0.16 \pm 0.01$	$0.2 \pm 0.01$	$0.17 \pm 1.03$	$0.16 \pm 1.05$	
C3	10.	Relative refractory period (ms)	$3.6 \pm 0.1$	$4.3 \pm 0.2$	3.6 ± 1.0	3.84 ± 1.1	
C3	32.	Refractoriness at 2 ms (%)	$25.1 \pm 5.3$	$43.1 \pm 5.5$	$27.8 \pm 6.4$	$22.6 \pm 11.7$	
C3	29.	Refractoriness at 2.5 ms (%)	$22.9 \pm 2.6$	$27.5 \pm 3.5$	21.1 ± 5	$19.2 \pm 6.1$	
C3	13.	Superexcitability (%)	-7.9 ± 2.1	$-2.4 \pm 0.8$	$-5.6 \pm 1.7$	$-6.5 \pm 1.9$	
C3	34.	Superexcitability at 5 ms (%)	$-5 \pm 0.7$	$-1.2 \pm 1.3$	$-4.2 \pm 0.4$	$-5.1 \pm 1.6$	
C3	33.	Superexcitability at 7 ms (%)	$-4 \pm 0.5$	-1.6 ± 1	$-3.2 \pm 0.6$	$-4 \pm 0.9$	
C3	14.	Subexcitability (%)	6 ± 0.4	$5.2 \pm 0.3$	$4.7\pm0.8$	$4.6 \pm 0.4$	
C4	07.	Resting I-V slope	$0.8 \pm 0.05$	$1.1 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.04$	$0.8 \pm 0.07$	
C4	08.	Minimum I-V slope	$0.2 \pm 0,01$	$0.25 \pm 0,01$	$0.25 \pm 0.01$	$0.26 \pm 0.02$	
C4	28.	Hyperpolarization I-V slope	$0.4 \pm 0.01$	$0.32\pm0.01$	$0.41 \pm 0.05$	$0.5 \pm 0.1$	
C5	27.	Accommodation half-time (ms)	30.5 ± 0.9	31.7 ± 1.4	31.7 ± 1.3	34 ± 2.8	
C5	26.	S2 accommodation	$20.4 \pm 1.4$	$17.5 \pm 1.2$	$18.7 \pm 1.3$	$15.8 \pm 1$	
C5	38.	S3 (-70%)	$11.3 \pm 2.2$	$6.2 \pm 2.1$	8.3 ± 2.6	$10.5 \pm 6.1$	
C5	12.	TEd (10-20 ms)	$50.2 \pm 1.9$	$44.6 \pm 2.2$	$51.4 \pm 1.3$	$48.3 \pm 5$	
C5	20.	TEd (40-60 ms)	35.3 ± 1.9	$32.9 \pm 2.1$	$38.3 \pm 1.2$	$35.8 \pm 4.6$	
C5	21.	TEd (90-100 ms)	$30.6 \pm 2.2$	$28.5 \pm 2.1$	$33.5 \pm 1$	$32.5 \pm 4.1$	
C5	23.	TEd (undershoot)	$-16.3 \pm 0.7$	$-13.5 \pm 1.1$	$-14.2 \pm 1.2$	$-12.3 \pm 1.2$	
C5	25.	TEd (peak, 40%)	$51.1 \pm 1.6$	$46.1 \pm 2.1$	$52.3 \pm 1.1$	$48.4 \pm 4.6$	
C5	35.	TEd (peak, 20%)	$29.4 \pm 1.1$	25.9 ± 1.6	$31.1 \pm 0.8$	$26.2 \pm 3.6$	
C5	22.	TEh (10-20 ms)	$-78.2 \pm 1.9$	$-66.8 \pm 2.2$	$-75.7 \pm 2.7$	$-76.5 \pm 4.2$	
C5	30.	TEh (20-40 ms)	$-88.5 \pm 2.7$	$-76.3 \pm 3.1$	$-87.3 \pm 3.1$	$-89.5 \pm 5.3$	
C5	11.	TEh (90-100 ms)	$-106.9 \pm 5$	$-88.1 \pm 5.6$	$-102.4 \pm 4.2$	$-107.7 \pm 7.3$	
C5	24.	TEh (overshoot)	6.3 ± 0.5	6.3 ± 0.7	5.2 ± 0.9	5.1 ± 1.5	
C5	31.	TEh (slope 101-140 ms)	$1.62 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.09$	$1.7 \pm 0.1$	
<sup>1</sup> C1: sti	<sup>1</sup> C1: stimulus-response relationship, C2: strength-duration relationship, C3: recovery cycle, C4: current-threshold						

 Table 1. Comparison of neuromuscular excitability parameters

relationship, and C5: threshold electrotonus .<sup>2</sup> TEd: threshold electrotonus from depolarizing currents and TEh: threshold electrotonus from hyperpolarizing currents. Derived excitability parameters (Mean  $\pm$  SEM) from plantar muscle recordings from sedentary control (n = 8), sedentary SMA (n = 8), running-trained SMA (Run SMA; n = 7) and swimming-trained SMA (Swim SMA; n = 4) mice. Differences between groups of animals were considered significant when p  $\leq 0.05$  (Highlighted in grey).

#### Figure legends

**Figure 1**: Both 10-months training programs improve muscle resistance to exercise and aerobic capabilities in type 3 SMA-like mice. (A, B, C and D) Quantification of creatine kinase activity (A and C) and lactate level (B and D) in the serum of sedentary controls and type 3 SMA-like mice (Control; SMA) at 2 months of age (A and B) after one bout of either running- (One Run) or swimming-exercises (One Swim) and in the serum of sedentary and 10-months-trained controls and type 3 SMA-like mice to running (Trained Run) or swimming (Trained Swim) at 12 months of age (C and D; n=12 in each group). Data are represented as mean  $\pm$  SD (\*, p<0.05).

Figure 2: Both 10-months training programs improve motor capabilities either specific adaptations in type 3 SMAlike mice. (A, B and C) Longitudinal measurements of the fore- and hind-limbs muscles strength (Grip strength test; A), the forelimbs muscles fatigability to low intensity efforts (Grip test; B) and the muscle resistance to maximal intensity efforts in swimming pool (the maximum water flow were fixed at 6 l.min<sup>-1</sup>, and is indicated by "M" and minimal sustained water flow was 3 l.min<sup>-1</sup> and is indicated by "m"; Swimming fatigability test; C) of sedentary control mice (Sed Control) compared to sedentary (Sed SMA), running-trained (Run SMA) and swimming-trained (Swim SMA) type 3 SMA-like mice from 2 to 12 months of age. (D) Endpoint measurements of the muscle resistance to maximal intensity efforts in treadmill (the maximum speed was fixed at 21 m.min<sup>-1</sup>, and is indicated by "M" and minimal sustained speed was fixed at 16 m.min<sup>-1</sup> and is indicated by "m"; Running fatigability test) of sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) and swimming-trained (Swim) type 3 SMAlike mice at 12 months of age. (E) Longitudinal measurements of the exploratory behavior (Open field test) of sedentary control mice (Sed Control) compared to sedentary (Sed SMA), running-trained (Run SMA) and swimming-trained (Swim SMA) type 3 SMA-like mice from 2 to 12 months of age. (F and G) Endpoint quantification of the spontaneous activity (F) and vertical rearing events (G) during 48 hours (48H Actimetry and 48H vertical rearing) in sedentary and trained to run (Run) or trained to swim (swim) control and type 3 SMA-like mice at 12 months of age (n=12 in each group). Data are represented as mean  $\pm$  SD (\*, p<0.05).

#### Figure 3: Type of exercise dependent neuroprotection of motor neurons subpopulations in type 3 SMA-like mice.

(A) Immunodetection of ChAT-positive motor neurons in the lumbar spinal cord (L1-L5) of sedentary control mice (left) compared to sedentary (middle left), running-trained (middle right) and swimming-trained (right) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (scale bar: 50  $\mu$ m). (B, C and D) Quantitative analysis of the number of total, medial and lateral motor neurons per ventral horn (B) and of the absolute number (C) and proportion (D) of motor neurons in small (>300  $\mu$ m<sup>2</sup>), intermediate (300-600  $\mu$ m<sup>2</sup>) and large (<600  $\mu$ m<sup>2</sup>) range of cell body area in spinal cords of

sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) and swimming-trained (Swim) type 3 SMAlike mice at 12 months of age (n=8 for each group). (E) *In situ* hybridization on *Chondrolectin* mRNA (*Chodl*) in lumbar spinal cords of sedentary control (top left) and type 3 SMA-like mice (top right) compared to running-trained (bottom left) and swimming-trained (bottom right) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (scale bar: 100  $\mu$ m). (F) Quantitative analysis of the number of *Chodl*-positive neurons in the ventral horn of lumbar spinal cords of sedentary control compared to sedentary, running-trained (Run) and swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (n=4 in each group). (G) Immunodetection of the slow-type motor-neuron marker estrogen-related receptor  $\beta$  (ERR $\beta$ , green) in the nucleus (Hoechst 33258, blue) of ChAT-positive motor-neurons (ChAT, red) in the lumbar spinal cords of sedentary type 3 SMA-like mice at 12 months of age (scale bar: 25  $\mu$ m). (H) Quantitative analysis of the number of ERRb-positive motor-neurons in the ventral horn of lumbar spinal cords of sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) or swimming-trained (Swim) type 3 SMAlike mice at 12 months of age (n=4 in each group). (I and J) Western blot analysis (I) and quantification (J) of SMN protein expression in the ventral lumbar spinal cord of sedentary control and type 3 SMA-like mice (Sed) compared to running-trained (Run) or swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (n=4 in each group). Data are represented as mean  $\pm$  SD (\*, p<0.05).

**Figure 4**: Both 10-months training programs reduce efficiently the neuromuscular junction defects in type 3 SMAlike mice. (A) Motor end-plates labeling with  $\alpha$ -bungarotoxin (green) and anti-neurofilament plus antisynaptophysin antibodies (NF+Synaptophysin, red) in the *soleus* of sedentary type 3 SMA-like mice at 12 months of age showing a typical pretzel-shaped (top) and a fragmented NMJ (bottom) (scale bar: 5 µm). (**B and C**) Quantification of the neuromuscular junction fragmentation (**B**) and area (**C**) in the *soleus, plantaris and tibialis* muscles from sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) or swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (n=4 in each group). Data are represented as mean  $\pm$  SD (\*, p<0.05).

**Figure 5**: *Muscle specific adaptations to different exercises reduce the SMA induced phenotypic alteration in a type 3 model mice.* (**A**) Hematoxylin-eosin staining on *plantaris* of sedentary control mice (left) compared to sedentary (middle left), running-trained (middle right) and swimming-trained (right) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (scale bar: 25 μm). (**B**, **C and D**) Quantification of the cross-section area of myofibers from *soleus* (**B**), *plantaris* (**C**) and *tibialis* (**D**) muscles of sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) and swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (n=4 in each group). (**E**) Immunodetection of type IIa Myosin Heavy Chain (MyHC) in the *plantaris* of sedentary control mice (top left) compared to sedentary

(middle left), running-trained (middle right) and swimming-trained (right) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (scale bar: 50  $\mu$ m). **(F)** Analysis of adults (*i.e.* I, II, IIa and IIx/IIb) MyHC isoforms typology of the *soleus*, *plantaris* and *tibialis* of sedentary control mice compared to sedentary, running-trained (Run) and swimming-trained (Swim) type 3 SMA-like mice at 12 months of age (n=4 in each group). Data are represented as mean  $\pm$  SD (\*, p<0.05).

**Figure 6**: *Both 10-months training programs counteract the neuromuscular excitability defect in a type 3 SMA-like mice.* **(A, B and C)** Superimposed excitability waveforms obtained *in vivo* by stimulating the tibial branch of the sciatic nerve and recording the CMAP from plantar muscle in a 3-way comparison: sedentary control mice compared to sedentary type 3 SMA-like mice **(A)** and sedentary type 3 SMA-like mice compared to running-trained **(B)** and to swimming-trained **(C)** type 3 SMA-like mice. The main differences in excitability parameters between sedentary control and SMA mice are indicated by black (when significant) or gray (when at the limit of significance) numbers (see Table 1 for corresponding parameters) and dashed lines or arrows. (1) Strength-duration relationship. (2) Recovery cycle. (3) Current-threshold relationship. (4) Threshold electrotonus (n=8 in each group). Data are represented as mean  $\pm$  SD (\*, p<0.05).





A













# Modulations du métabolisme et de l'autophagie induites par l'exercice physique dans un modèle souris de sclérose latérale amyotrophique (SLA)

De plus en plus d'études suggèrent un rôle important du métabolisme énergétique dans la pathogenèse de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Ainsi, une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline et un hypermétabolisme lipidique sont très souvent retrouvés chez les patients et dans les modèles animaux de SLA. Cependant, les bases cellulaires et moléculaires qui soustendent ces altérations restent largement méconnues. Une récente étude menée dans un modèle souris de SLA, indique qu'un dysfonctionnement de la pyruvate déshydrogénase (PDH) induirait, dans les muscles rapides, un déséquilibre des voies cataboliques vers une utilisation privilégiée des lipides, et non plus du glucose. Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer dans quelles mesures un programme ciblé d'exercice physique pourrait réorienter les voies métaboliques vers une utilisation privilégiée du glucose dans les souris SOD1(G93A), modèle de SLA. Nous avons comparé les effets de deux types d'entraînement, l'un basé sur un exercice de course de faible intensité, assimilable à un exercice d'endurance, l'autre basé sur un exercice de nage à forte intensité, assimilable à un exercice de force/résistance. Contrairement à la course, l'exercice de nage réduit significativement l'intolérance au glucose, augmente le taux sanguin de lactate et le stockage lipidique dans les adipocytes. Dans le muscle rapide tibialis, touché très précocement par la maladie, nous mettons en évidence une altération de l'expression de GLUT4, transporteur musculaire majeur du glucose, et de la glyceraldehyde-3 phopshate deshydrogenase (GAPDH), une enzyme clé de la glycolyse. Ces altérations moléculaires sont retrouvées dans des biopsies musculaires de patients SLA. L'entraînement à la nage des souris SLA stimule l'expression de GLUT4 et de GAPDH, grâce à la réactivation de processus d'autophagie, et réactive les enzymes du métabolisme aérobie, telles que la citrate synthase, enzyme du cycle de Krebs, et la cytochrome oxydase, appartenant à la chaîne respiratoire mitochondriale. Quoique moins efficace, l'entraînement à la course induit des effets similaires à la nage. De manière intéressante, l'ensemble de ces adaptations s'effectuent indépendamment d'une modulation de PDH. Enfin, dans le tibialis des souris SLA, l'entraînement à la nage stimule l'expression des transporteurs des lipides, VLDLR et CD36, ainsi que l'expression d'enzymes lipogéniques telles que FAS et DGAT1, cette dernière étant connue dans les muscles, pour coupler la synthèse des lipides et la lipolyse. Ces adaptations sont corrélées à une augmentation significative de la quantité de triglycérides musculaires.

L'ensemble de ces données indique qu'un exercice bien calibré peut améliorer le métabolisme énergétique dans un contexte de SLA, et ouvre la voie à une utilisation de l'exercice physique en complément d'une potentielle modulation pharmacologique de la PDH chez les patients.