



HAL
open science

Rôle du muscle squelettique dans la Sclérose Latérale Amyotrophique : apport de modèles transgéniques conditionnels

Gina Picchiarelli

► **To cite this version:**

Gina Picchiarelli. Rôle du muscle squelettique dans la Sclérose Latérale Amyotrophique : apport de modèles transgéniques conditionnels. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ054 . tel-02918072

HAL Id: tel-02918072

<https://theses.hal.science/tel-02918072>

Submitted on 20 Aug 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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Inserm U1118

THÈSE présentée par :

Gina PICCHIARELLI

soutenue le : **13 septembre 2018**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences et sciences de la Santé**

**Rôle du muscle squelettique dans la Sclérose
Latérale Amyotrophique : apport de modèles
transgéniques conditionnels**

THÈSE dirigée par :

Mr. DUPUIS Luc

Directeur de recherche,
Université de Strasbourg

THÈSE codirigée par :

M. LOEFFLER Jean-Philippe

Directeur de recherche,
Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. MILLECAMPS Stéphanie

Chargée de recherche,
Université de Paris

M. SCHAEFFER Laurent

Professeur des universités - Praticien Hospitalier,
Université de Lyon

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. BARROT Michel

Directeur de recherche,
Université de Strasbourg

M. PRADAT Pierre-François

Clinicien-neurologue,
Hôpitaux de Paris

Remerciements

Une thèse, c'est effectivement un travail scientifique de longue haleine mais c'est également une aventure humaine très enrichissante.

Tout particulièrement, je souhaite remercier **Luc Dupuis**, mon directeur de thèse. Ton enthousiasme et ton raisonnement scientifique m'ont donné envie de faire de la recherche. Je te remercie énormément pour l'implication et le soutien dont tu as fait preuve tout au long de ma thèse. Merci pour tous tes conseils, pour la confiance que tu m'as accordée et pour l'aide que tu m'as apportée dans le choix de ma carrière professionnelle.

Je remercie **Jean-Philippe Loeffler**, de m'avoir accueillie dans son laboratoire mais aussi pour le soutien qu'il m'a apporté durant cette période.

Je souhaiterais remercier les membres du jury, **Stéphanie Millecamps**, **Laurent Schaeffer**, **Michel Barrot** et **Pierre-François Pradat**, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Durant ma thèse, j'ai eu le plaisir de collaborer avec **Erik Storkebaum**, **Maria Demestre**, **Edor Kabashi**, **Clotilde Lagier-Tourenne**, **Nicolas Charlet-Berguerand** et bien-sûr **Chantal Sellier** que je souhaite remercier pour tout le savoir-faire et les discussions intéressantes qu'ils m'ont apportées.

Je remercie particulièrement **José Gonzalez de Aguillar** pour son aide précieuse dans mes moments de réflexion intenses. La bonne humeur et les nombreux conseils que tu m'as apportés m'ont beaucoup aidé durant ces années de thèse.

J'adresse également toute ma reconnaissance aux membres permanents du laboratoire, **Frédérique René**, **Caroline Rouaux**, **Sylvie Grosch**, **Brigitte Kuenemann**, **Jérôme Sinniger**, **Annie Picchinenna**, **Marie-Jo Ruivo** pour avoir rendu agréable au quotidien le travail au laboratoire.

Un grand merci **Christine**, qui m'a soutenue depuis mon arrivée en thèse. Merci pour tes conseils et pour tous ces moments à discuter (de choses scientifiques bien-sûr ;)). J'ai beaucoup appris à tes côtés pendant ces années et je te remercie pour tous ces souvenirs que nous avons créés ensemble.

Stéphane, en plus de m'avoir formé, tu as été présent tout au long de ma thèse. Pas seulement au niveau professionnel mais également au niveau personnel. Tu m'as très souvent remonté le moral et du coup, tu as beaucoup beaucoup pris sur toi pour m'écouter parler, parler, parler et encore parler. Comme quoi, ce qui ne te tue pas te rend plus fort haha.

Robin, en plus d'être beau, charismatique, royal et divin, je voulais te remercier pour ta bonne humeur constante et ton sens de l'humour qui te caractérise si bien. Grâce à toi, j'allais au laboratoire tous les jours en chantant, je dirais même plus, en chantant des chansons de Disney. Je connais à présent toutes les paroles : « sous l'océan... il y a pleins de poissons » ;) .

Comment oublier mon partenaire de paillasse, **Thibaut** ! Tu as rendu mes journées plus agréables et chaque jour, j'étais pressée de venir manipuler pour avoir la suite de ton épisode d'« amour, gloire et beauté » ;).

Je souhaite ensuite remercier **Imma, Alexandra, Althéa** pour les nombreux fous rires et ces moments inoubliables que j'ai passé avec vous. Vous faites parties de ces personnes que j'ai adoré découvrir de jours en jours.

Merci à mes pipelettes, **Florian et Marc-Antoine**, c'est rare de trouver des personnes aussi bavardes que moi. Grâce à vous les pauses passaient extrêmement vite ! Merci pour votre humour et votre bonne humeur.

Mathieu, c'est avec plaisir que nous avons à nouveau travaillé ensemble. Après le DUT, le master, se retrouver lors de ma thèse était une évidence ! J'espère te retrouver lors de mon prochain job pour encore profiter de ta gentillesse, ta générosité et ta joie de vivre.

Merci aux nouvelles recrues **Aurore et Cyril**, qui sont également mes relecteurs officiels, pour leur sourire et leur grain de folie. Merci Cyril pour ta reprise de « Tragédie » et Aurore pour ta reprise de « Manau » au karaoké, vous m'avez donné de quoi me moquer plusieurs années.

Mes chaleureux remerciements au reste de mes collègues **Jelena, Raphaëlle, Hajer, Laura, Alexandre, Aurélie, Lavinia**, et **Pauline** pour ces bons moments passés au laboratoire et durant les congrès. Je remercie également mes « padawans », **Alice Bernard, Arnaud Engasser** et **Jessica Tueux** pour leur travail.

Je remercie énormément **Alexia et Charlys** pour leur soutien durant cette période. Merci pour les nombreuses soirées où vous m'avez sorti du labo ;). Alexia, plus qu'une collègue, tu es devenue une amie, un pilier sur lequel je peux compter.

Merci à **Géraldine**, ma compatriote de galère depuis le master. Merci pour ta bonne humeur et ton humour. Grâce à toi, même les situations les plus compliquées deviennent risibles.

Comment t'oublier, **Chikita**, dans mes remerciements. Pleine de vie, de joie et d'enthousiasme, tu es la petite bouffée d'air frais de Boulange qui me requinquait les week-ends. Merci **Stéphanie**, pour ces moments de folie passés avec toi et pour ces moments de détente avec **Lauriane** ;).

Je souhaite particulièrement remercier mes petits marspichois et marspichoises : **Juh, Ysa, Jans Jorys, Momo, Loic, Jordan, Thibaut, Léa** et **Sarah**, qui étaient mes rayons de soleil malgré la pluie environnante de Lorraine haha. Votre soutien et votre joie de vivre me motivent jours après jours.

Enfin, merci **François** d'avoir été là pour moi depuis toutes ces années, dans les hauts et les bas, dans les doutes et la joie. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir été ma source de motivation.

Table des matières

Avant-propos.....	1
Chapitre 1 : Sclérose latérale amyotrophique (SLA).....	3
I. Aspects cliniques de la SLA.....	3
I.1. Epidémiologie	3
I.2. Caractérisation clinique de la SLA.....	5
I.3. Diagnostic.....	8
I.4. Evaluation de la progression de la SLA	10
I.5. Traitements de la SLA	14
II. Mécanismes pathologiques de la SLA	20
II.1. Facteurs génétiques.....	20
II.2. Toxicité protéique	27
II.3. Métabolisme de l'ARN	32
II.4. Transport axonal et cytosquelette.....	36
II.5. Séparation en phase liquide	39
III. SLA : une maladie multicellulaire	42
III.1. Neurones moteurs	43
III.2. Cellules gliales	45
III.3. Neurones sérotoninergiques.....	48
Chapitre 2: Muscle Squelettique et rôle dans la SLA	50
I. Structure du muscle strié squelettique.....	50
II. Structure et développement d'une fibre musculaire	51
II.1. Différents types de fibre	52
II.2. Anatomie des myofibrilles	53

II.3.	Myogenèse d'une fibre musculaire chez l'adulte.....	55
II.4.	Les Mef2.....	57
III.	Couplage neuromusculaire.....	60
IV.	Transcription des AchR.....	64
IV.1.	Transcription dans les noyaux sous-synaptiques.....	64
IV.2.	Transcription dans les noyaux extra-synaptiques.....	66
V.	Rôle du muscle dans la SLA	68
Chapitre 3 : Fused in Sarcoma.....		80
I.	Structure.....	80
II.	Rôle de Fus	81
II.1.	Réparation de l'ADN	81
II.2.	Transcription	81
II.3.	Épissage.....	82
II.4.	Synthèse de l'ARN.....	83
II.5.	Stabilité de l'ARN	83
II.6.	Transport de l'ARN.....	83
II.7.	Traduction.....	84
III.	La SLA liée à la pathologie <i>FUS</i>	86
III.1.	Les mutations <i>FUS</i> dans la SLA	86
III.2.	Accumulation de <i>FUS</i> dans le cytoplasme	87
III.3.	Agrégats cytoplasmiques de <i>FUS</i> et granules de stress.....	89
III.4.	Altération du métabolisme de l'ARN	90
IV.	Modèles animaux de SLA basés sur la mutation de <i>FUS</i>	91
IV.1.	Modèles de perte de fonction de <i>Fus</i>	91

IV.2.	Modèles de gain de fonction de <i>Fus</i>	93
IV.3.	Modèles combinant la perte et le gain de fonction de <i>Fus</i>	96
	Objectifs et problématique de la thèse.....	101
	Résultats	105
I.	Publication 1 : Rôle de FUS au sein de la jonction neuromusculaire (soumis)	105
II.	Publication n°2 : Rôle de FUS dans le muscle (en préparation).....	160
	Discussion	193
III.	Identification du rôle de FUS dans le muscle	193
III.1.	Rôle de FUS dans la JNM	193
III.2.	Rôle de <i>Fus</i> dans le muscle.....	196
IV.	Contribution du muscle dans la SLA.....	199
V.	Une toxicité rétrograde pour le muscle dans la SLA ?	202
VI.	Identification d'un nouveau mécanisme pour les RBP.....	205
VII.	Rôle de <i>Fus</i> dans les synapses cholinergiques	207
	Conclusion	211
	Annexes	213
	Bibliographie	229

Table des illustrations

Figure 1 : Facteurs de risque de la SLA.....	5
Figure 2 : Les différents sites d'apparition de la SLA et les symptômes associés.....	6
Figure 3 : Différentes populations cellulaires sont à l'origine des signes cliniques de la SLA	7
Figure 4 : Grille d'évaluation de la SLA.....	13
Figure 5 : Mécanismes pathologiques proposés pour C9ORF72 dans la SLA	23
Figure 6 : Les gènes impliqués dans la SLA, adaptation de (Taylor et al 2016)	25
Figure 7 : Les nouveaux gènes de SLA et leurs implications au sein des différents mécanismes pathologiques.....	26
Figure 8 : Altération de l'homéostasie protéique dans la SLA.....	31
Figure 9 : Altération du métabolisme de l'ARN dans la SLA	35
Figure 10 : Altération du cytosquelette dans la SLA	38
Figure 11 : Mécanismes pathologiques impliqués dans la SLA.....	41
Figure 12 : La SLA est une maladie multicellulaire.....	42
Figure 13 : Structure du muscle strié squelettique.....	51
Figure 14 : Présentation des différents types de fibres dans le muscle gastrocnémien marqué à la succinate déshydrogénase.	52
Figure 15 : Structure d'une myofibrille	54
Figure 16 : Myogenèse chez l'adulte.....	56
Figure 17 : Structure des MEF2.....	58
Figure 18 : Vue d'ensemble de la contraction musculaire.....	60
Figure 19 : Molécules impliquées dans la formation de la partie post-synaptique de la jonction neuromusculaire.	63
Figure 20 : Transcription des AchR.....	67
Figure 21 : Structure de FUS.....	80
Figure 22 : Les fonctions physiologiques de FUS	85
Figure 23 : Structure de FUS et ses mutations dans la SLA.....	86
Figure 24 : Accumulation de FUS dans le cytoplasme au cours de la SLA.	88

Figure 25 : Agrégats FUS au cours de la SLA.	90
Figure 26 : Modèles animaux de SLA liés à la mutation FUS	99
Figure 27 : Les phénotypes des différents modèles SLA-FUS utilisés au laboratoire suggèrent une toxicité du mutant FUS dans un autre tissu.	103
Figure 28 : Rôle de FUS au sein de la jonction neuromusculaire	106
Figure 29 : Rôle de FUS dans le muscle.....	161
Figure 30 : La toxicité présente chez les souris $Fus^{\Delta NLS/+}$ suit un profil de « dying back »	204

Abréviations

5HIAA : 5-hydroxyindoleacetic acid
Ach : Acétylcholine
AChE : Acétylcholine Estérase
AChR : récepteurs nicotiniques de l'Acétylcholine
ALS FRS : ALS Functional Rating Scale
ARNm : ARN messenger
ChAT : Acétylcholine transférase
COX : Cyclo-oxygenase
DFT : Démence Fronto-Temporale
FUS : Fused In Sarcoma
HSA : Actine squelettique humaine
IBM : Myosite à inclusion
JENH : réparation par jonction des extrémités non homologue
JNM : Jonction Neuro Musculaire
LCD : Low complexity domain
LCR: Liquide céphalo rachidien
LLPS : Liquid liquid phase separation
MEF2 : Myocyte enhancer factor 2
MRF: Myogenic Regulator Factor
MUSK : Muscle specific receptor tyrosine kinase
NLS : Nuclear localization signal, Séquence de localisation nucléaire
NM : Neurones Moteurs
NRG : Neuréguline β 1
RBP : RNA binding protein, protéine de liaison à l'ARN
RRM : domaine de liaison à l'ARN
SBMA : Amyotrophie bulbo-spinale
SDH : Succinate deshydrogénase
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
SMA : Amyotrophie spinale infantile
RH : recombinaison homologue
UM : Unité motrice

Avant-propos

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative dont les premiers symptômes apparaissent chez l'adulte, généralement vers 60 ans. Elle affecte sélectivement le système moteur et provoque une paralysie progressive amenant au décès du patient par défaillance respiratoire en quelques années. La maladie peut débuter par une faiblesse musculaire asymétrique, une dysarthrie, une dysphagie ou encore des fasciculations de la langue. Certaines formes de SLA sont causées par des mutations au niveau de gènes spécifiques parmi lesquels on retrouve le gène *FUS*. Les mutations dans ce gène sont responsables de formes très sévères de SLA affectant de jeunes adultes et entraînant leur décès dans les 6 mois à deux ans suivant le diagnostic. A ce jour il n'existe aucun traitement curatif pour cette maladie fulgurante. La compréhension de la physiopathologie de la maladie est donc indispensable à la conception d'un traitement adapté à chaque forme de SLA.

Au cours de la SLA, la jonction neuromusculaire (JNM), cette synapse spécialisée entre le neurone moteur et la fibre musculaire, est la première structure à être affectée. En effet, la JNM est détruite avant le corps cellulaire du neurone moteur (NM). Des données de notre laboratoire démontrent d'ailleurs l'existence de défauts musculaires au cours de la maladie qui pourraient contribuer à la neurodégénérescence observée chez les patients et les modèles animaux. Bien que la SLA soit actuellement décrite comme une maladie multicellulaire, l'implication du muscle dans la pathologie reste à éclaircir.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier la contribution du muscle dans la SLA grâce à un modèle murin de SLA présentant une mutation du gène *Fus*.

La première partie de mon introduction sera consacrée à une présentation de la SLA suivie d'un rappel des connaissances actuelles sur le muscle squelettique et sa contribution dans la pathologie. Enfin, la dernière partie de mon introduction présentera la protéine FUS, son rôle physiologique et son rôle au sein de la SLA.

Introduction

Chapitre 1 : Sclérose latérale amyotrophique (SLA)

La sclérose latérale amyotrophique, aussi connue sous le nom de maladie de Charcot car décrite par le neurologue français Jean-Martin Charcot en 1865, est une maladie neurodégénérative de l'adulte âgé de 50 à 60 ans. Comme son nom l'indique, elle est caractérisée par une amyotrophie, c'est-à-dire une diminution du volume musculaire. Par ailleurs, la dégénérescence des neurones moteurs laisse place à un tissu cicatriciel (sclérose) dans la partie latérale de la moelle épinière (sclérose latérale). Cette maladie incurable est caractérisée par la mort progressive des neurones moteurs corticaux-spinaux (neurones moteurs supérieurs) ainsi que des neurones moteurs spinaux et bulbaires (neurones moteurs inférieurs) (Brooks et al 1995, Bruijn et al 2004, Cleveland & Rothstein 2001, Julien 2001). La dégénérescence des neurones moteurs corticaux spinaux est généralement associée à certains symptômes, comme l'hyper réflexie, le signe de Babinski et la spasticité tandis que la mort des neurones moteurs spinaux et bulbaires entraîne une faiblesse musculaire ou encore des fasciculations. Enfin, l'insuffisance respiratoire est la cause la plus fréquente de décès du patient, elle a généralement lieu dans les 3 ans après le diagnostic.

I. Aspects cliniques de la SLA

I.1. Epidémiologie

I.1.1. Incidence et prévalence

La SLA est la maladie la plus fréquente du neurone moteur chez l'adulte (Worms 2001) devant la maladie de Kennedy et la sclérose latérale primaire. En Europe, la prévalence de la maladie est estimée à 2,6 - 3 cas pour 100 000 personnes et son incidence est de 2,58 pour 100 000 personnes par an (Couratier et al 2016, van Es et al 2017). En France, les données collectées ont montré une prévalence de 6000 personnes atteintes de SLA ainsi qu'une incidence de 3 à 4 nouveaux cas par jour (Couratier et al 2016).

I.1.2. Répartition géographique

La répartition géographique de la SLA est encore mal caractérisée en raison du nombre insuffisant de données recueillies. Toutefois, une forte fréquence de SLA a été observée en Nouvelle Guinée et dans les îles du Pacifique notamment l'île de Guam. Il est possible que la tradition culturelle dans ces îles, à savoir la consommation de viande de chauve-souris, puisse être liée à ce foyer de cas à la fois de syndromes parkinsoniens et de SLA. Cette hypothèse est basée sur le fait que les chauves-souris se nourrissent de noix de cycas. Celles-ci renferment une forte concentration de la toxine L-β-méthylaminoalanine que l'on retrouve ensuite dans leur viande. Cette toxine cause les symptômes de SLA (Delzor et al 2014, Kurland 1988, Spencer et al 1987). Cette hypothèse d'une toxicité liée à une SLA/Guam a amené la question du rôle des facteurs exogènes dans la pathologie.

I.1.3. Facteur de risques

Dans la SLA, des **facteurs exogènes** comme endogènes pourraient être à l'origine de la pathologie. Des facteurs environnementaux tels que l'exposition à des métaux lourds (Gresham et al 1986), des toxines, des virus (Douville et al 2011) et l'exposition à des pesticides (Malek et al 2012) ont montré leur implication dans la SLA. Le mode de vie peut également être un facteur aggravant notamment la pratique excessive de sport, le tabagisme, un faible indice de masse corporelle ainsi qu'un régime alimentaire faible en antioxydants et acides gras polyinsaturés (Pupillo et al 2014a). Concernant les **facteurs endogènes**, les hommes sont plus atteints par la SLA que les femmes. Une étude de Couratier et collaborateurs en 2016 a montré que les hommes sont trois fois plus touchés par la SLA que les femmes. D'autres études suggèrent un risque augmenté de 50% chez l'homme. Il a également été montré que les conditions médicales peuvent prédisposer à la SLA. Une association a été faite entre des antécédents de traumatisme crânien et la SLA (Chen et al 2007a). Les maladies métaboliques pourraient aussi être un facteur de risque de SLA. En effet, des maladies auto-immunes ainsi que le diabète de type 1 sont associés à un risque élevé de SLA (Mariosa et al 2015, Turner et al 2013). Enfin, un lien entre la SLA et les maladies inflammatoires, notamment la sclérose en plaque pourrait exister (Ismail et al 2013).

Par ailleurs, des mutations dans plusieurs gènes prédisposent à l'apparition de la pathologie. Enfin, l'âge ainsi que la zone d'apparition de la maladie peuvent aggraver la pathologie. Ces différents aspects seront détaillés dans la suite de ce chapitre.

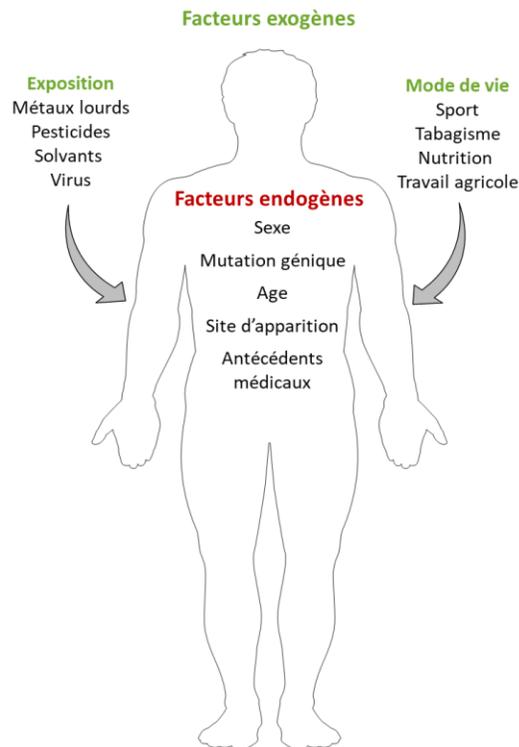


Figure 1 : Facteurs de risque de la SLA.

La SLA peut être causée par des facteurs exogènes tels qu'une exposition à des agents toxiques ou plus généralement le mode de vie. Cependant les facteurs endogènes comme le sexe, la génétique ou encore les antécédents familiaux contribuent également à la SLA. Adaptation de (Ingre et al 2015).

1.2. Caractérisation clinique de la SLA

1.2.1. Age d'apparition de la maladie

La SLA affecte majoritairement des personnes âgées de plus de 60 ans et entraîne leur décès dans les 3 à 5 ans suivant le diagnostic de la maladie. Cependant, il existe des formes juvéniles se déclarant avant 25 ans et caractérisées par une progression lente (Orban et al 2007). Les formes tardives, quant à elles, se déclarent après 75 ans et sont associées à une progression très rapide de la maladie (Chio et al 2009, Eisen et al 1993, Pupillo et al 2014b). L'âge d'apparition de la SLA est donc corrélé à la survie des patients.

1.2.2. Sites d'apparition de la maladie

Le site d'apparition de la maladie est corrélé au pronostic vital. Dans la SLA, trois sites ont été identifiés : respiratoire, bulbaire et spinal. La **forme respiratoire** est la moins représentée (5% des patients SLA) mais elle correspond à la forme la plus sévère de la maladie engendrant le décès du patient généralement dans les 18 mois après le diagnostic. Elle touche principalement les hommes et entraîne des dyspnées et orthopnées. La deuxième forme, également associée à un mauvais pronostic vital, est la **forme bulbaire**. Elle entraîne le décès du patient en moyenne dans les 2 ans après le diagnostic. Celle-ci concerne 20% des patients SLA qui présentent alors des signes de faiblesse des muscles bulbaires c'est-à-dire du pharynx, larynx et des muscles de la langue. Ces patients présenteront des fasciculations de la langue ainsi que des problèmes d'élocution et de déglutition. Enfin la **forme spinale** représente 75% des cas de SLA et est caractérisée par une atrophie musculaire, une faiblesse musculaire, des fasciculations ainsi qu'une hyper-réflexie et une hypertonie. Cette forme SLA présente la progression la moins sévère (Renton et al 2014, Swinnen & Robberecht 2014, Wijesekera & Leigh 2009).

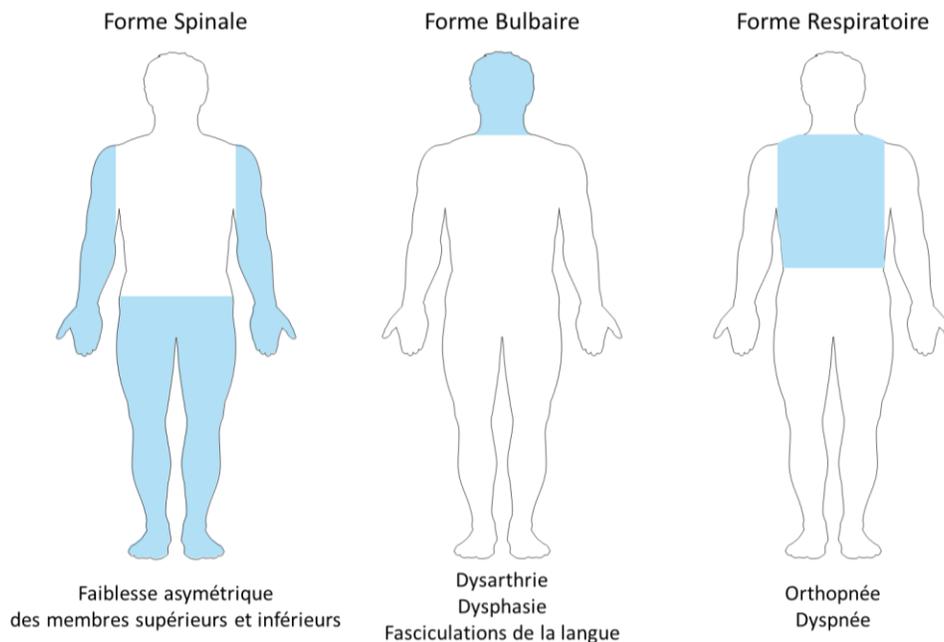


Figure 2 : Les différents sites d'apparition de la SLA et les symptômes associés

La SLA peut se déclarer de trois façons différentes. La forme spinale affecte les membres supérieurs et inférieurs et cause un affaiblissement musculaire asymétrique. La forme bulbaire au niveau des muscles bulbaires et entraîne des troubles d'élocution, de déglutition et des fasciculations de la langue. Enfin, la forme respiratoire affecte les muscles respiratoires.

I.2.3. Signes cliniques de SLA

D'un point de vue clinique, la SLA est décrite par la perte des **NM supérieurs**. Il est supposé que cette lésion soit à l'origine de l'hyper-réflexie, de l'hypotonie ainsi que de la spasticité. Cependant, les données récentes de notre laboratoire montrent que les neurones sérotoninergiques contribuent également à l'apparition de ces symptômes (El Oussini et al 2017).

La dégénérescence des **NM inférieurs**, quant à elle, est à l'origine de dysphasie, dysarthrie, faiblesse musculaire, atrophie musculaire, fasciculation et de crampes.

Enfin, la SLA est également caractérisée par des **troubles comportementaux** tels que des problèmes de concentration ou une désinhibition mais aussi par des **troubles métaboliques** notamment une perte de poids (Jelsone-Swain et al 2012, Zarei et al 2015).

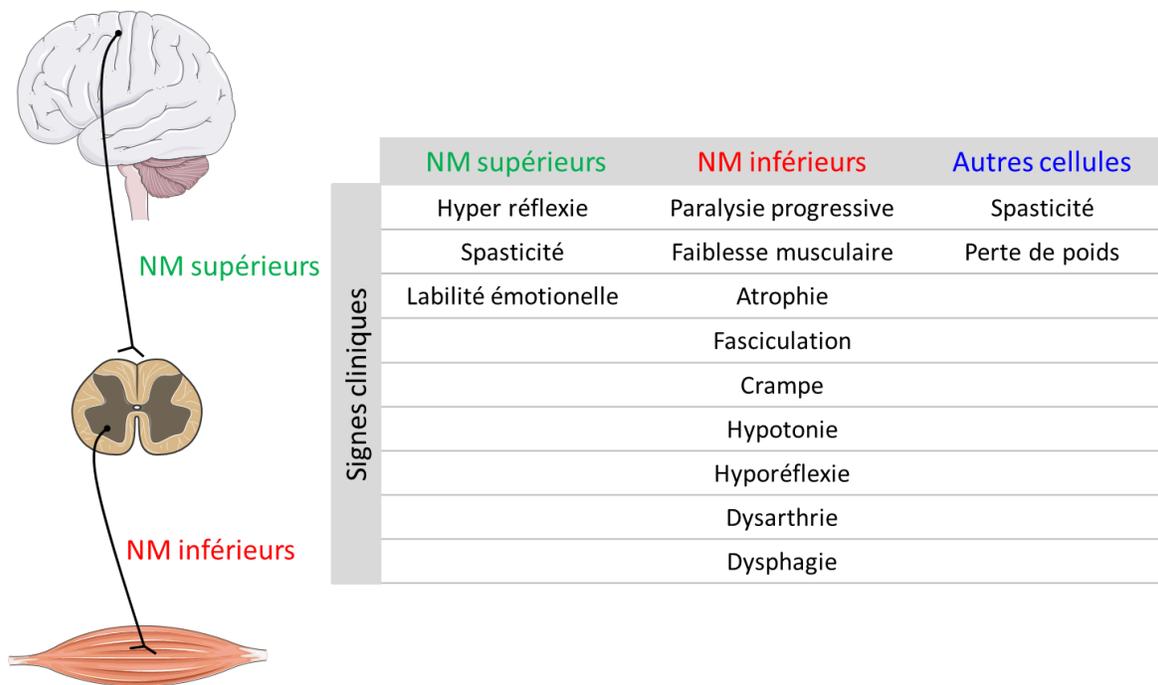


Figure 3 : Différentes populations cellulaires sont à l'origine des signes cliniques de la SLA. La SLA est caractérisée par une dégénérescence des NM supérieurs et inférieurs. La perte des NM supérieurs entraîne une hyper-réflexie, une spasticité et une instabilité émotionnelle tandis que la perte des NM inférieurs entraîne une paralysie, une faiblesse musculaire ou encore des fasciculations. Enfin, d'autres types cellulaires sont impliqués dans la pathologie et sont responsables de la perte de poids et de la spasticité.

I.3. Diagnostic

Le diagnostic de la SLA est basé sur la recherche de ces différents symptômes cliniques. Une SLA est diagnostiquée quand sont observées simultanément la dégénérescence des NM supérieurs et inférieurs. Le degré de certitude du diagnostic est analysé à l'aide des critères définis par le critère d'El Escorial, et ceci est confirmé grâce à différents examens visant à étudier la neurodégénérescence et l'atteinte musculaire.

I.3.1. Etude de la dégénérescence des neurones moteurs

I.3.1.1. Critère de El Escorial

Les critères de El Escorial ont été établis en 1994 par Brooks et collaborateurs et sont basés sur l'atteinte clinique résultant de la dégénérescence des NM et de la zone de développement de cette atteinte (Brooks 1994). Ces critères permettent de définir si le diagnostic de SLA est suspecté, possible, probable ou définitif. La SLA est **suspectée** lorsqu'une seule région présente des signes d'atteintes des NM supérieurs et inférieurs. Une SLA est **possible** lorsque les NM supérieurs sont affectés dans deux régions spinales ou lorsqu'une région présente une atteinte conjointe des NM supérieurs et inférieurs. On parle de SLA **probable** quand ces deux populations de neurones sont affectées dans deux régions. Enfin, lorsque trois régions présentent des atteintes des NM supérieurs et inférieurs, la SLA est **définie** (Costa et al 2012).

I.3.1.2. Neuro-imagerie

Malgré le critère d'El Escorial, le diagnostic de la maladie reste difficile à établir en raison d'un nombre important de maladies présentant des symptômes similaires telles que l'amyotrophie spinale progressive de l'adulte ou le syndrome de Kennedy. Au moment de leur décès, 10% des patients SLA n'ont rempli qu'un critère de « SLA éventuel » selon l'échelle d'El Escorial (Traynor et al 2000). L'**imagerie par résonance magnétique (IRM)** constitue une aide au diagnostic de la SLA et à l'évaluation de la progression de la maladie. Pour confirmer une SLA, il est par exemple possible d'observer l'épaisseur du cortex moteur qui est diminuée chez les patients SLA (Senda et al 2011). D'autre part, l'**IRM fonctionnelle**, qui étudie les activités cérébrales par variation de flux sanguin, est également un outil intéressant afin de distinguer une SLA d'autres

maladies. En effet, plusieurs études ont montré une augmentation de l'activation du cortex sensorimoteur controlatérale, lors de test de motricité chez des patients, ainsi que des déficits du lobe frontal caractérisés par une réduction de l'activation du cortex préfrontal dorsolateral (Agosta et al 2010, Konrad et al 2006, Schoenfeld et al 2005, Stanton et al 2007).

I.3.2. Etude de l'atteinte musculaire

I.3.2.1. Electromyographie

Afin de confirmer le diagnostic, le dysfonctionnement des NM inférieurs peut être étudié par électrophysiologie et biopsie musculaire. Les patients SLA présentent une dénervation musculaire se traduisant par une augmentation de l'amplitude et de la durée du potentiel d'action lors de l'électromyographie. Des signes de fasciculations et de fibrillations traduiront également la dégénérescence des NM inférieurs. L'EMG est donc utilisé en routine pour améliorer la certitude du diagnostic (Joyce & Carter 2013, Julien 2001, Sorenson 2012).

I.3.2.2. Etude du nombre d'unités motrices

Une autre façon d'estimer la dénervation chez les patients consiste à estimer le nombre d'unités motrices (UM). Cette technique a été décrite pour la première fois en 1971 par Allan Mc Comas et permet de mesurer le nombre d'axones qui innervent un muscle ou un groupe de muscles (McComas et al 1971). Pour cela, la taille des UM est mesurée puis leur recrutement est calculé en se basant sur la réponse à une stimulation nerveuse percutanée. Le nombre d'UM est ensuite calculé en divisant la taille de cette réponse par la taille moyenne des UM (Wang et al 2004). Plus ce nombre est important, plus le nombre d'axones innervant le muscle est important. De cette façon, il est alors possible de suivre la maladie au cours du temps (Bromberg & Brownell 2008). En effet, au cours de la SLA, le nombre d'UM diminue. A noter qu'il existe une deuxième technique d'étude du nombre d'unités motrices : la technique « motor unit number index ». Le calcul de cette technique est basé sur la comparaison de l'aire et de la puissance d'un potentiel d'action musculaire après une stimulation supramaximale. Elle permet d'évaluer le nombre d'unités motrices fonctionnelles plutôt qu'une mesure absolue de leur nombre.

I.3.2.3. Biopsie musculaire

En complément de l'électromyographie, une biopsie musculaire peut être effectuée dans le but d'identifier une atrophie, des signes de dénervation ou de nécrose et des groupes de fibres anormales.

I.3.3. Etude du génome

Près de 20% des cas de SLA présentent des antécédents familiaux, on parle de SLA familiale. Dans ce cas, la principale cause de la pathologie est une mutation génétique. Plus de 40 gènes ont été associées à la SLA notamment *SOD1*, *FUS*, *TARDBP* ou encore *C9ORF72*. Les mutations identifiées sont détaillées dans la partie « Mécanismes physiopathologiques – facteurs génétiques ». Les tests génétiques permettent donc de vérifier la mutation d'un des gènes impliqués dans la SLA et ainsi confirmer le diagnostic (Peters et al 2015).

I.4. Evaluation de la progression de la SLA

La SLA est une maladie en constante évolution, de ce fait il est nécessaire d'évaluer régulièrement la progression de la maladie afin d'adapter la prise en charge. Quatre paramètres seront pris en compte lors de l'évaluation : les fonctions motrices, les troubles bulbaires, la capacité respiratoire et de façon plus générale, l'incapacité dans une tâche quotidienne. L'état fonctionnel du patient est mesuré avec différents scores dont le score ALS FRS, utilisé en routine.

I.4.1. Bilan musculaire

La force motrice est évaluée par une évaluation manuelle des muscles (testing manuel musculaire) selon une échelle de 0 à 5.

- 0 correspondant à une absence de contraction
- 1 correspondant à une contraction sans mouvement
- 2 correspondant à un mouvement partiel
- 3 correspondant à un mouvement complet
- 4 correspondant à un mouvement complet face à une résistance de degré faible
- 5 correspondant à un mouvement complet face à une résistance de degré élevé

I.4.2. Evaluation des troubles bulbaires

L'atteinte bulbaire présente dans la SLA entraîne des troubles d'élocution et/ou de déglutition. Afin d'évaluer la progression de ces symptômes, la grille d'évaluation de Auzou est la plus utilisée (Ozsancak et al 2002). Elle est constituée de 8 catégories : caractéristiques de la hauteur du son (aigu ou grave), caractéristiques du volume de la voix, timbre, résonance, respiration, prosodie (intonation), articulation, intelligibilité. Un score de 0 à 4 servira d'appréciation pour les capacités bulbaires du patient : 0 étant « aucune anomalie » et 4 étant une « anomalie sévère ou permanente ».

I.4.3. Score ALS FRS

En 1997, Cedarbaum et collaborateurs créent l'échelle fonctionnelle « ALS Functional Rating Scale » permettant d'évaluer de façon générale l'incapacité motrice en notant des actions du patient dans sa vie quotidienne. Chacune d'elles seront notées de 0 à 4, où 0 est une perte totale de la capacité évaluée et 4 représente une fonction normale. En 1999, Cedarbaum et collaborateurs proposent une révision de cette échelle (ALS FRS-R), incluant de nouveaux critères tels que l'évaluation de la dyspnée, l'ortopnée et le besoin d'assistance respiratoire (Cedarbaum et al 1999). A ce jour, l'ALS FRS-R est l'instrument le plus utilisé pour évaluer la progression de la maladie.

1. Parole	4-Normale
	3-Perturbation
	2-Intelligible avec répétition
	1-Utilise occasionnellement une communication non verbale
	0-Perte de la parole
2. Salivation	4-Normale
	3-Hypersialorrhée discrète avec bavage nocturne
	2-Hypersialorrhée modérée mais permanente
	1-Hypersialorrhée gênante
	0-Bavage continu nécessitant l'utilisation d'un mouchoir
3. Déglutition	4-Normale
	3-Quelques fausses routes
	2-Consistance des aliments modifiée
	1-Suppléments alimentaires
	0-Alimentation parentérale exclusive
4. Ecriture	4-Normale
	3-Lente et imprécise mais compréhensible
	2-Tous les mots ne sont pas compréhensibles
	1-Tient un stylo mais incapable d'écrire
	0-Incapable de tenir un stylo
5. Hygiène	4-Normale
	3-Autonome mais avec efficacité diminuée
	2-Assistance occasionnelle ou substitution
	1-Assistance d'une tierce personne
	0-Assistance permanente totale
6a. Préparation des aliments	4-Normale
	3-Lente et maladroite mais seul
	2-Aide occasionnelle pour couper les aliments
	1-Les aliments ne sont préparés mais mange seul
	0-Doit être nourri
6b. En cas de gastrostomie	4-Utilisation normalement autonome
	3-Maladroit mais toutes les manipulations sont effectuées seul
	2-Aide nécessaire pour la mise en place
	1-Fourni une aide minime aux soignants
	0-Doit être nourri

7. Mobilisation au lit	4-Normale
	3-Lenteur et maladresse mais autonome
	2-Ajuste les draps avec difficultés
	1-Peut bouger mais pas se retourner dans le lit
	0-Dépendant
8. Marche	4-Normale
	3-Difficulté de déambulation
	2-Marche avec assistance
	1-Mouvement sans déambulation
	0-Pas de mouvement de jambes
9. Montée d'escaliers	4-Normale
	3-Lente
	2-Fatigue
	1-Aide nécessaire
	0-Impossible
10. Dyspnée	4-Absente
	3-A la marche
	2-Dans au moins 1 des situations: repas, toilette, habillage
	1-Au repos, difficultés respiratoires en position assise ou allongée
	0-Difficulté importante, ventilation mécanique envisagée
11. Orthopnée	4-Absente
	3-Quelques difficultés pour dormir la nuit en raison d'un souffle court, utilisation de 2 oreillers
	2-Besoin de plus de 2 oreillers
	1-Ne peut dormir qu'assis
	0-Ne peut pas dormir
12. Insuffisance respiratoire	4-Absente
	3-Utilisation intermittente d'une assistance respiratoire
	2-Utilisation continu d'une Ventilation Non Invasive la nuit
	1Utilisation continu d'une VNI la nuit et le jour
	0-Ventilation mécanique invasive par intubation ou trachéotomie

Figure 4 : Grille d'évaluation de la SLA.

La progression de la maladie est évaluée par la « ALS Functional Rating Scale ». Cette grille évalue l'incapacité motrice au cours d'une action de la vie quotidienne. Une note de 0 à 4 sera attribuée:

0 correspond à une perte totale de la capacité évaluée et 4 représente une fonction normale. Adaptation de (Cedarbaum et al 1999)

I.5. Traitements de la SLA

La sévérité et la progression rapide de la maladie nécessitent une prise en charge rapide et conséquente. Malheureusement, il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la SLA, toutefois la progression de la maladie peut être ralentie grâce à des traitements médicamenteux, des traitements symptomatiques non médicamenteux ou encore à l'aide de thérapies diverses.

I.5.1. Traitements médicamenteux

I.5.1.1. Riluzole

De nos jours, le Riluzole est le seul traitement prolongeant la survie des patients (Bensimon et al 2002, Bensimon et al 1994, Turner et al 2001, van Es et al 2017). A raison d'une dose unique journalière de 100mg ou de deux doses journalières de 50mg durant 18 mois, le riluzole prolongera la survie de 2 à 3 mois en moyenne (Miller et al 2007). Bien qu'il soit connu comme agissant sur les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), le mécanisme d'action détaillé de cet agent neuroprotecteur reste incertain. En effet, il inhibe la libération de glutamate de la partie pré-synaptique et augmente l'absorption du glutamate extracellulaire par les astrocytes (Distad et al 2008). Il est important de noter que les autres traitements anti-glutamatergiques qui ont été testés chez les patients sont inefficaces, suggérant donc que l'action protectrice du riluzole passe par d'autres propriétés pharmacologiques. De fait, le riluzole pourrait être aussi efficace *via* son action d'inhibition des courants persistants entrants dans les NM (Urbani & Belluzzi 2000).

I.5.1.2. Edavarone

En mai 2017, la FDA, Food and Drug Administration, a autorisé l'utilisation de l'Edavarone en traitement de la SLA. Lors de cette étude, 137 patients ont reçu une dose de 60mg en intraveineuse durant 6 cycles, au total 24 semaines (4 semaines par cycles avec 2 semaines de traitement et 2 semaines sans traitement). Cet agent anti oxydant a permis de ralentir le déclin fonctionnel et de préserver les fonctions respiratoires (Writing & Edaravone 2017). Aucune information n'est disponible sur l'effet de l'edaravone sur la survie. Il convient de noter que ce traitement, non autorisé en Europe, est très lourd pour le patient en raison de la nécessité de perfusions régulières.

I.5.1.3. Rasagiline

La rasagiline est un inhibiteur de la monoamine oxydase B utilisé dans la maladie de Parkinson pour modifier la neurotransmission. Ces propriétés anti-apoptotiques et neuroprotectrices ont été mises en lien avec la SLA pour la première fois en 2004. En effet, Waibel et collaborateurs ont montré que la rasagiline, seule ou en combinaison avec le riluzole, augmente l'espérance de vie et les fonctions motrices des souris SLA possédant une mutation SOD1^{G93A} (Waibel et al 2004).

Ces résultats encourageants ont conduit Macchi et ses collaborateurs à conduire une étude, en 2015, durant laquelle 23 patients ont été suivis sur l'intégralité des 12 mois au Canada et aux Etats-Unis (Macchi et al 2015). Les patients âgés de 21 à 80 ans ont reçu *per os* 2mg de rasagiline par jour durant ces 12 mois. Il a été montré que la rasagiline ne modifie pas le score ALS FRS-R des patients SLA, cependant elle est bien tolérée par les patients SLA et les biomarqueurs mitochondriaux sont modifiés, traduisant ainsi une stabilisation mitochondriale et une diminution du stress oxydatif. Un essai à plus grande échelle a été réalisé (Ludolph et collaborateurs, 2018, soumis à Lancet Neurol), et suggère que, si la rasagiline ne semble pas efficace sur la population générale de patients SLA, elle pourrait amener une protection chez les patients ayant une progression rapide de la SLA. Un essai stratifié sur la progression initiale de la maladie est cependant nécessaire pour démontrer cet effet rigoureusement.

I.5.2. Traitements symptomatiques

I.5.2.1. Traitements symptomatiques médicamenteux

Des traitements médicamenteux sont largement utilisés dans le cas de SLA afin de soigner divers symptômes associés à la maladie. En effet, des analgésiques peuvent être délivrés afin de réduire la **douleur**, du Lorazepam en cas **d'anxiété** et de laryngospasme, ou encore du carbamazepine pour de réduire les **crampes** musculaires. La **labilité émotionnelle**, c'est-à-dire la variabilité et l'instabilité émotionnelle, ainsi que la **salivation** peuvent être stabilisées à l'aide de dextrometorphane. Enfin, pour la **dépression** et les **insomnies**, de l'amitriptyline peut être délivrée tandis que pour la **constipation** du lactulose peut être prescrit (Radunovic et al 2007, Wijesekera & Leigh 2009).

Récemment, l'équipe de Smith et collaborateurs a montré que le Nuedexta améliore les **fonctions bulbaires** chez les patients SLA (Smith et al 2017). Le Nuedexta est un médicament composé de 20 mg de bromhydrate de dextrométhorphan et de 10 mg de sulfate de quinidine. Il est utilisé afin de traiter la labilité émotionnelle du syndrome pseudo bulbaire chez l'adulte. Ce syndrome est caractérisé par une atteinte de NM centraux associée à des troubles de la déglutition, d'élocution et une paralysie de la langue et des lèvres. Afin de limiter l'instabilité émotionnelle, le nuedexta agit sur le système nerveux central, notamment sur les récepteurs NMDA et le transporteur de la sérotonine. Il présente également un effet inhibiteur du métabolisme oxydatif. Ce médicament, autorisé aux Etats-Unis, a été testé sur 60 patients durant une trentaine de jours et a montré une amélioration de l'élocution, de la déglutition ainsi que de la salivation chez des patients atteints de SLA. Cependant aucune amélioration de la locomotion et des capacités respiratoires n'a été constatée.

I.5.2.2. Traitements symptomatiques non médicamenteux

I.5.2.2.1. Nutrition

Au cours de la SLA, une **perte de poids est observée chez les patients**. En 2013, O'Reilly et collaborateurs ont montré que les patients SLA présentent un indice de masse corporel plus faible, tandis que Peters et collaborateurs en 2017 ont démontré que la perte de poids pouvait précéder les symptômes moteurs (Mariosa et al 2017, O'Reilly et al 2013).

Par ailleurs, **l'IMC est négativement corrélé à la survie** (Desport et al 1999, Marin et al 2011, Paganoni et al 2011) et une **corrélation a également été établie entre la perte de poids et la sévérité de la maladie**, mesurée par le score ALSFRS (Dupuis et al 2008, Lindauer et al 2013).

En 2004, Dupuis et collaborateurs ont étudié les effets d'une intervention nutritionnelle sur un modèle murin SOD1^{G86R}. Il a été montré qu'un déficit métabolique apparaît dès le stade pré-symptomatique de la SLA entraînant une diminution du poids des souris. De plus, l'apport d'un régime gras améliore les fonctions métaboliques, retarde l'apparition de la SLA et prolonge la survie de 20% (Dupuis et al 2004). **Une stratégie thérapeutique pour pallier les défauts métaboliques consisterait à délivrer un régime gras aux patients SLA.**

Cette stratégie a été testée par Wills et collaborateurs en 2014. Lors de cette étude, 6 patients sont inclus dans le groupe contrôle, 8 patients ont reçu une alimentation riche en calories et riche en carbohydrates (HC/HC) et 8 patients ont reçu un régime riche en calories et riches en gras (HF/HC) durant 4 mois (Wills et al 2014). Après la diète, les patients ont été suivis pendant 5 mois durant lesquels aucun patient n'est décédé dans le groupe HC/HC comparé au groupe contrôle présentant 3 décès. Le groupe HF/HC quant à lui, ne montre pas de différence significative par rapport au groupe contrôle. Cette étude préliminaire a montré que **la nutrition entérale hypercalorique est sûre et tolérée par le patient** ce qui encourage à renouveler cette étude chez un plus grand nombre de patients.

L'optimisation des stratégies thérapeutiques nécessite la caractérisation des mécanismes associés à la perte de poids. Des études ont montré que l'hypermétabolisme musculaire et l'altération de l'hypothalamus sont responsables de la perte de poids dans la SLA. En 2004, Dupuis et collaborateurs montrent une réduction de l'accumulation des tissus adipeux, une augmentation des dépenses énergétiques et un **hypermétabolisme musculaire** sont observés chez des souris SOD1^{G86R}. De plus, une diminution des taux de leptine, l'hormone de la satiété, apparaît avant l'apparition des symptômes moteurs. Tout ceci se traduit par une diminution du poids corporel des souris SOD1^{G86R}. Plus récemment, Palamiuc et collaborateurs en 2015 ont montré que les souris SOD1^{G86R}, à un stade asymptotique, sont plus endurantes et présentent une inhibition de la capacité du muscle glycolytique à utiliser le glucose comme source d'énergie. Par ailleurs, une diminution de la pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), une enzyme mitochondriale impliquée dans la régulation du glucose, est observée chez les souris malades et un rétablissement de l'équilibre métabolique par modulation de l'activité des PDK favorise la prise de poids et retarde l'apparition des symptômes et de la dénervation. Cette étude montre que les altérations métaboliques sont présentes à un stade précoce de la maladie et contribuent à la SLA notamment par la régulation de la prise de poids (Palamiuc et al 2015).

Le deuxième mécanisme participant à la perte de poids dans la SLA implique l'**hypothalamus** qui est une région du système nerveux central régulant les fonctions vitales de l'organisme notamment la prise alimentaire (Vercruysse et al 2018). Afin d'étudier les défauts métaboliques présents dans la SLA, Vercruysse et collaborateurs en 2016, ont étudié l'effet de la pioglitazone,

un médicament avec un effet métabolique, sur des souris SOD1, FUS et TDP-43 (Vercruysse et al 2016). Les résultats montrent que la pioglitazone n'augmente pas la prise alimentaire en raison d'une altération des neurones hypothalamiques. En effet, une diminution des taux de proopiomelanocortin (POMC) et une augmentation des taux de l'inhibiteur agouti-related protein (AGRP) a été constatée dans les trois modèles murins de SLA. L'importance de l'hypothalamus a été confirmée chez les patients SLA grâce à l'étude de Gorges & Vercruysse en 2017 montrant une atrophie de l'hypothalamus chez les patients SLA (Gorges et al 2017). Cette diminution du volume hypothalamique corrèle avec l'indice de masse corporelle des patients SLA sporadiques comme familiaux. Enfin, le volume de l'hypothalamus antérieur corrèle avec l'âge d'apparition de la SLA.

I.5.2.2.2. Ventilation

Lors de la SLA, les patients développent des insuffisances respiratoires dues à la défaillance des muscles respiratoires. Afin de compenser ces désordres respiratoires, le recours à la ventilation non invasive (sans trachéotomie) est indispensable. Celle-ci prolonge la survie de 7 mois en améliorant la qualité de vie des patients (Bourke et al 2006). La ventilation non invasive est donc préconisée dans tous les cas de SLA et peut également être utilisée dans le cas où le patient considère que cela améliore sa qualité de vie. Il est important de préciser que si la ventilation non invasive augmente vraisemblablement la survie, la stimulation diaphragmatique directe semble être très délétère (Gonzalez-Bermejo et al 2016, McDermott & Stavroulakis 2015).

I.5.2.3. Thérapie multidisciplinaire

La prise en charge du patient tout de long de sa maladie implique la présence d'une équipe médicale multidisciplinaire. Des physiothérapeutes, des kinésithérapeutes et des ergothérapeutes aideront le patient à se déplacer et gérer sa posture. Des orthophonistes participeront au maintien de la communication du patient. Enfin, des psychothérapeutes l'aideront à faire face à la maladie.

I.5.3. La thérapie génique, une perspective à court terme ?

Dans la plupart des formes familiales de SLA, les mutations sont connues pour provoquer la maladie *via* un gain de fonction. Il est donc tentant de concevoir une approche thérapeutique par diminution de l'expression des formes mutées. Cette approche a été mise au point dans le contexte des mutations *SOD1*. Pour cela, des oligonucléotides antisens de 15 à 25 nucléotides ont été mis au point. Pour le moment, il est encore difficile de juger l'efficacité de cette thérapie mais les premiers essais cliniques montrent déjà une tolérance à l'injection d'oligonucléotides ciblant *SOD1* (Miller et al 2013). Une stratégie similaire est en cours de mise au point pour le gène *C9ORF72* (Donnelly et al 2013, Lagier-Tourenne et al 2013). Ces premières avancées suggèrent que l'utilisation d'ARN pourrait être une option thérapeutique dans le traitement de la SLA. Il est à noter que cette même stratégie expérimentale est à la base d'un traitement extrêmement efficace contre l'amyotrophie spinale (Finkel et al 2017, Mercuri et al 2018).

II. Mécanismes pathologiques de la SLA

La difficulté de trouver un traitement curatif, ou même un traitement symptomatique, adapté à chaque patient provient de la multitude de mécanismes physiopathologiques observés dans la SLA. Plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires sous tendant la variabilité phénotypique de la SLA ont été décrits, que ce soient les facteurs génétiques, la toxicité protéique, le métabolisme de l'ARN ou encore le transport axonal et cytosquelette. Améliorer la compréhension de ces mécanismes permettra l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques.

II.1. Facteurs génétiques

Certaines formes de SLA sont familiales et liées à des mutations dans différents gènes. Les plus documentées sont *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* et *C9ORF72*. Les avancées dans les études génomiques ont révélé l'implication d'un grand nombre de gènes dans la SLA. Plus de 40 mutations ont été associées à la SLA à ce jour.

II.1.1. SOD1

En 1993, les mutations du gène codant pour la superoxyde dismutase 1, *SOD1*, sont les premières à avoir été identifiées dans la SLA (Rosen et al 1993). Elles représentent 20% des cas familiaux et 1% des cas sporadiques. Cette enzyme anti oxydante induit la catalyse des anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène dans toutes les cellules, afin de réaliser une détoxification cellulaire. Dans la SLA, plus de 170 mutations ont été caractérisées dans le gène et entraînent un stress oxydatif, c'est-à-dire un déséquilibre entre les anti-oxydants et les pro-oxydants. Ces mutations provoquent aussi des défauts mitochondriaux, un stress du réticulum endoplasmique, une hyper excitabilité cellulaire ou encore une détérioration du transport axonal (Beckman et al 1993).

Pour expliquer ces mécanismes, l'hypothèse d'une perte de fonction de la *SOD1* avait été proposée cependant elle a été vite exclue par plusieurs arguments génétiques et expérimentaux.

- 1) Il n'y a aucune corrélation entre la gravité de la maladie et l'atteinte de l'activité catalytique de la SOD1. Certaines mutations (G85R) touchent le site catalytique et diminuent fortement l'activité de l'enzyme, mais d'autres, tout aussi sévères (G93A) ne modifient pas l'activité anti-oxydante.
- 2) L'ablation du gène murin *Sod1* ne provoque pas le développement de la maladie (Reaume et al, 1996).
- 3) La surexpression de formes mutées actives ou non catalytique provoque une maladie dans un contexte où les deux copies endogènes sont préservées.
- 4) L'ablation de *Sod1* chez les souris transgéniques n'aggrave pas la maladie. La surexpression de la SOD1 sauvage ne l'améliore pas, et au contraire, l'exacerbe.

En conclusion, il y a actuellement un consensus sur le fait que les mutations SOD1 puissent provoquer une SLA via un gain de fonction toxique. Ce gain de fonction pourrait être une propagation de type prion de la protéine SOD mutée.

II.1.2. TARDBP

Les mutations dans le gène *TARDBP*, codant pour la protéine TDP-43, représentent 3% des cas familiaux et 1,5% des cas sporadiques de SLA (Lattante et al 2013). La toxicité de TDP-43 est induite par deux mécanismes. Tout d'abord, par la formation d'agrégats cytoplasmiques de TDP-43 phosphorylée dans le cerveau et la moelle épinière de patients SLA sporadiques mais aussi par l'intermédiaire de mutations affectant le domaine prion-like de TDP-43 (Neumann et al 2006). Les mutations de cette séquence confèrent alors à TDP-43 une perte de fonction nucléaire et un gain de fonction toxique. La perte de fonction de TDP-43 est connue pour accélérer la pathologie mais les agrégats ne sont pas nécessaires pour la neurodégénérescence (Arnold et al 2013, Mitchell et al 2015).

II.1.3. FUS

En 2009, FUS, une protéine de liaison à l'ARN appartenant à la famille FET (FUS, EWS, TAF15) a été identifiée dans la SLA. Cette protéine sera caractérisée plus en détail dans la suite du mémoire.

II.1.4. C9ORF72

En 2011, il a été rapporté que les répétitions d'hexanucléotides G4C2 dans le gène C9ORF72 sont à l'origine de cas de SLA et de démences fronto-temporales (DFT) (DeJesus-Hernandez et al 2011, Renton et al 2011). Actuellement, le gène C9ORF72 est le plus fréquemment identifié dans la SLA. Il est retrouvé dans 39% des cas familiaux de SLA et dans 7% des cas sporadiques (Majounie et al 2012). Les patients porteurs de cette mutation présentent des symptômes de SLA et/ou de DFT tels qu'une paralysie, une désinhibition ou encore une perte d'empathie (Rohrer et al 2015). Le mécanisme pathologique impliquant C9ORF72 reste encore à éclaircir mais des études ont d'ores et déjà montré l'importance du nombre de répétition de l'expansion G4C2. En condition physiologique, le nombre de répétitions est d'une vingtaine mais ce nombre est très fortement augmenté chez les patients SLA et DFT, pouvant atteindre des centaines voire des milliers de répétitions. De plus, le nombre de répétitions est corrélé à l'âge d'apparition de la maladie et à son pronostic (Gijselinck et al 2016). Trois hypothèses tentent d'expliquer le mécanisme pathologique sous-jacent de ces expansions. Premièrement, les expansions entraîneraient une diminution de l'expression de C9ORF72 et causeraient une haploinsuffisance. Deuxièmement, une toxicité de l'ARN serait la cause de la SLA liée à C9ORF72. Cette hypothèse est née, en partie, de l'observation d'agrégats de protéines de liaison à l'ARN (RBP) mutantes. Les ARNs contenant les répétitions sens GGGGCC et antisens CCCCGG transcrites du mutant C9ORF72 entraînent la séquestration de RBP et la production de répétitions dipeptidiques (DPR). La dernière hypothèse est donc que les protéines DPR sont toxiques et provoquent un gain de fonction toxique (Jiang & Cleveland 2016).

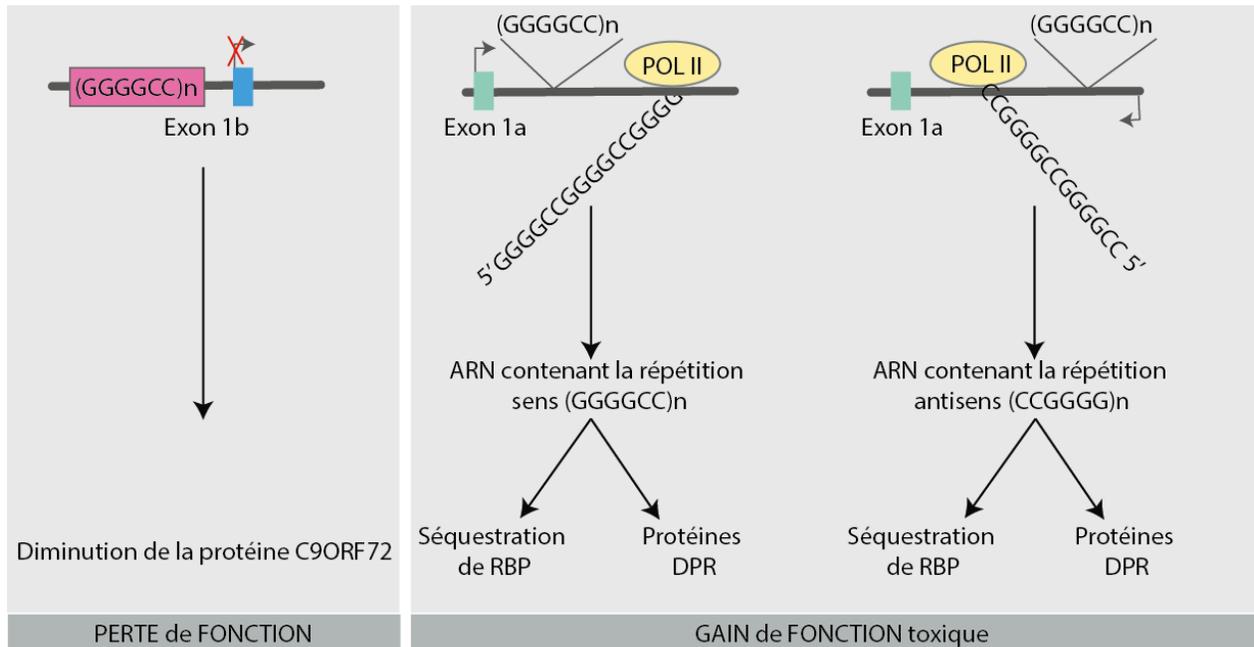


Figure 5 : Mécanismes pathologiques proposés pour C9ORF72 dans la SLA

La toxicité de C9ORF72 pourrait être expliquée par deux mécanismes pathologiques. La première hypothèse propose une inhibition de la transcription de C9ORF72 entraînant une diminution de la protéine tandis que la deuxième hypothèse propose un gain de fonction toxique des répétitions sens GGGGCC et antisens CCGGGG. Ces répétitions sens et antisens pourraient alors séquestrer des protéines de liaison à l'ARN (RBP) ou entraîner la formation de répétitions dipeptidiques (DPR) toxiques (Adaptation de Jiang et al 2016).

II.1.5. TBK-1

L'implication de TBK-1, TANK-Binding Kinase 1, a été observée pour la première fois dans la SLA en 2015 (Cirulli et al 2015). Cirulli et collaborateurs ont montré que ce gène contribue à 1% des cas de SLA. Puis l'étude de Freischmidt et collaborateurs chez 252 patients SLA et 827 contrôles a confirmé le rôle de *TBK1* dans la maladie en montrant que l'haploinsuffisance de *TBK1* cause des formes familiales et sporadiques de SLA. De plus, TBK1 est connu pour son effet dans l'autophagie et l'inflammation, deux voies d'intérêt émergentes dans la SLA. TBK1 est également colocalisée avec deux autres protéines impliquées dans la SLA dans les autophagosomes : SQSTM1 et OPTN. Elle est également capable de phosphoryler OPTN et SQSTM1, facilitant ainsi la liaison de OPTN à LC3, une protéine essentielle à l'autophagosome. Il y aurait alors une augmentation sélective de l'autophagie des mitochondries endommagées (Richter et al 2016).

II.1.6. KIF5A

En mars 2018, une étude collaborative internationale entre 250 chercheurs a comparé 20 806 personnes souffrant de SLA et 59 804 personnes saines. Le résultat de cette étude est l'identification de KIF5A comme un nouveau gène de SLA (Brenner et al 2018, Nicolas et al 2018). KIF5A, kinesin family member 5A, est un gène exprimé dans les neurones et responsable du transport axonal. En effet, le knock-out de KIF5A entraîne une altération du transport axonal des neurofilaments (Xia et al 2003). Etant donné l'hypothèse grandissante d'une altération du cytosquelette dans la pathogenèse de la SLA, le rôle de KIF5A dans le cytosquelette pourrait être intéressant dans la SLA. Actuellement, il a été montré que les mutations de type « perte de fonction » dans la partie C terminale de KIF5A entraînent une apparition précoce de la SLA à 46 ans mais une survie plus longue, en moyenne de 117 mois contre 20 à 36 mois dans les formes précédemment établies. Le mécanisme pathologique impliquant KIF5A reste à déterminer.

II.1.7. Les autres gènes de la SLA

Les autres gènes correspondent à 40% des cas de SLA. Parmi cette proportion un certain nombre a été identifié. Les gènes de la SLA sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Année	Gène	Locus	Protéine	Fonctions	% FALS
2018	KIF5A	12q13.3	Kinesin Family Member 5A	Transport axonal des neurofilament	?
2016	SCFD1	14q12	Sec1 Family Domain Containing 1	Transport vésiculaire	?
2016	MOBP	3p22.1	Myelin-Associated Oligodendrocyte Basic Protein	Métabolisme du cytosquelette	<1
2016	NEK1	4q33	NIMA Related Kinase 1	Réparation de l'ADN, métabolisme du cytosquelette	3
2016	C21ORF2	21q22.3	C21ORF2	Homéostasie protéique, Réparation ADN	?
2015	TBK1	12q14.1	TANK-binding kinase 1	Autophagie, inflammation	?
2014	CHCHD10	22q11.23	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10	Protéine mitochondriale	<1
2014	TUBA4A	2q36.1-2q35	A-tubulin 4a	Sous unité des microtubules	<1
2014	MATR3	5q31.2	Matrin3	Protéine de liaison à l'ARN	<1
2014	UNC13A	19p13.11	Protein Unc-13 Homolog A	Neurotransmission	?
2013	HNRNPA1	12q13.1	hnRNP A1	Protéine de liaison à l'ARN	<1
2012	PFN1	17p13.2	Profilin 1	Protéine de liaison à l'actine	<1
2011	SQSTM1	5q35	p62	Adaptateur autophagique	<1
2011	UBQLN2	Xp11.23-Xp13.1	Ubiquilin 2	Adaptateur autophagique	<1
2011	C9ORF72	9p21-22	C9ORF72	Transcription, épissage	25
2010	OPTN	10p15-p14	optineurin	Adaptateur autophagique	4
2010	VCP	9p13.3	Vasolin containing protein	Ségrégation de l'ubiquitine	1-2
2010	ATXN2	12q24.12	Ataxin 2	Métabolisme de l'ARN	<1
2010	DAO	12q22-23	D-aminoacide oxidase	Signalisation glutaminergique	<1
2009	FUS	16p11.2	FUS/TLS	Protéine de liaison à l'ARN	5
2008	TARDBP	q36	TDP43	Protéine de liaison à l'ARN	5
2006	ANG	14q11	Angiogenin	Ribonucléase	<1
2004	SETX	9q34	Senataxin	Métabolisme de l'ARN	<1
2004	VAPB	20q13.3	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	Trafic vésiculaire	<1
2003	DCTN1	2p13	Dynactin	Composant de la dynéine	1
2001	ALSIN	2q33-2q35	Rho guanine nucleotide exchange factors	Trafic endosomal	<1
1993	SOD1	21q22.1	Cu/Zn superoxide dismutase	Super oxyde dismutase	20

Figure 6 : Les gènes impliqués dans la SLA, adaptation de (Taylor et al 2016)

Cette énorme avancée dans l'architecture génétique de la SLA est due aux études d'association génomique (genome-wide association study, GWAS) qui ont fortement amélioré la détection de polymorphismes génétiques et identifié de nouveaux locus tel que *MOBP* et *SCFD1* (van Rheenen et al 2016). Une vue d'ensemble sur les données relatives aux gènes impliqués dans la SLA ont permis de mettre en lumière trois grandes catégories de mécanismes impliqués dans la SLA : la toxicité protéique, le métabolisme de l'ARN et les défauts axonaux et du cytosquelette.

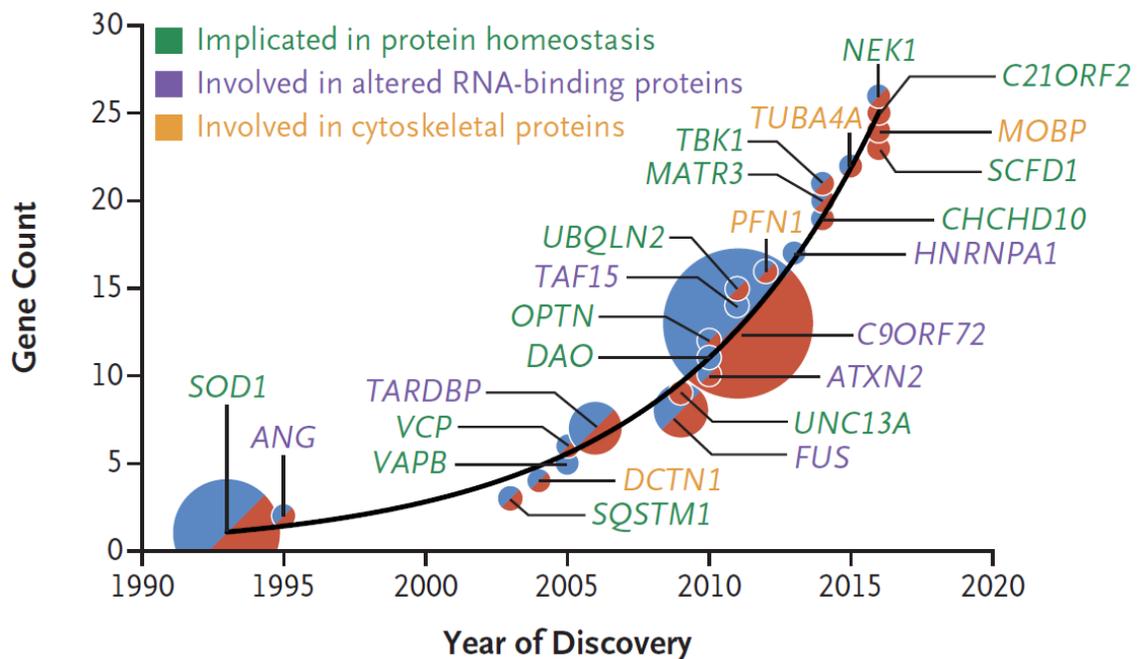


Figure 7 : Les nouveaux gènes de SLA et leurs implications au sein des différents mécanismes pathologiques.

Les connaissances actuelles sur la génétique et la physiopathologie de la SLA ont permis de repenser les mécanismes à l'origine de la pathologie. La SLA pourrait être expliquée par une altération du cytosquelette, de l'homéostasie protéique et du métabolisme de l'ARN. Les cercles rouges représentent les formes sporadiques de SLA et les cercles bleus représentent les formes familiales de SLA. Image tirée de (Brown & Al-Chalabi 2017).

II.2. Toxicité protéique

Un des mécanismes impliqués génétiquement dans la SLA est l'homéostasie protéique. En effet, de très nombreux gènes liés à la SLA modifient la stabilité des protéines, entraînant la formation d'agrégats protéiques. Ces gènes peuvent également causer une dérégulation de la maintenance et la dégradation protéique ainsi qu'une propagation par un mécanisme de type prion.

II.2.1. Agrégats

Une des signatures neuropathologiques de la SLA est la formation d'agrégats protéiques. Parmi les diverses protéines impliquées dans la SLA, il est connu que les mutations de SOD1 entraînent la **formation d'agrégats cytoplasmiques**. En effet, des **agrégats de la forme mutée de SOD1 (mSOD1)** mais aussi de sa forme sauvage après modifications post-traductionnelles, ont été observés chez les patients souffrant de SLA (Bosco et al 2010b, Forsberg et al 2010, Ray et al 2004). L'apparition de ces agrégats de mSOD1 dans les neurones moteurs et les astrocytes coïncide avec le déclenchement de la maladie chez la souris (Bruijn et al 1998).

TDP-43 comme SOD1, forme des inclusions cytoplasmiques chez les patients. Cependant dans le cas de TDP-43, ces inclusions sont présentes aussi bien chez les patients sporadiques que familiaux TDP-43. La protéine TDP-43 est **clivée, phosphorylée et ubiquitinée** dans ces inclusions (Brettschneider et al 2013, Giordana et al 2010, Neumann et al 2006). D'autres études visant à caractériser ces agrégats ont montré que la phosphorylation de TDP-43 est un événement précoce dans la formation d'agrégats dans les cas sporadiques de SLA (Neumann et al 2009a).

Dans la même catégorie que TDP-43, FUS (une protéine de liaison à l'ARN) a été détectée sous forme d'inclusion chez les patients SLA. Cette partie sera détaillée dans le chapitre suivant.

Enfin, chez les patients **C9ORF72**, l'expansion G4C2 entraîne la production de **protéines répétées dipeptidiques** se retrouvant accumulées sous forme **d'inclusions cytoplasmiques** dans les cellules neuronales et gliales de patients SLA et DFT (Ash et al 2013, Mann et al 2013, Mori et al 2013). Par ailleurs, ces protéines répétées dipeptidiques s'accumulent sous formes d'inclusions intranucléaires et cytoplasmiques composées de p62 et d'ubiquitine.

II.2.2. Maintenance et dégradation protéique

En plus de ces agrégats cytoplasmiques, les deux voies de la machinerie de dégradation des protéines peuvent être perturbées : la **voie protéosomale dépendante de l'ubiquitine** et la **voie autophagique**. Le protéasome, qui est un complexe enzymatique formé de deux sous-unités 20S et 19S, est responsable de la dégradation des protéines. Celui-ci peut être la cible des protéines mutantes impliquées dans la SLA. La forme mutée de SOD1 semble, par exemple, interagir directement avec la sous-unité 19S du protéasome et de ce fait inhiber son action (Urushitani et al 2002). La SLA peut également être associée à des mutations de **sequestosome 1**, SQSTM1 (Fecto et al 2011), une protéine codant pour p62. Les mutations de cette protéine sont à l'origine de défauts de dégradations protéiques dans diverses maladies neurodégénératives. D'autres mutations dans **Valosin-containing-protein (VCP)** et **l'ubiquilin 2** empêchent également la ségrégation et la dégradation protéosomale des protéines ubiquitinées (Deng et al 2011, Watts et al 2007). La mutation P56S de **VAPB**, quant à elle, entraîne la formation d'agrégats ubiquitinés dans les neurones moteurs de la moelle épinière de souris mutées VAPB56S (Tudor et al 2010). Dans un modèle de *C.elegans* présentant une mutation ponctuelle P56S de VAPB, Tsuda et collaborateurs en 2008 ont confirmé la présence d'une ubiquitination et ont montré une accumulation d'inclusions dans le réticulum endoplasmique et un repliement anormal de la protéine (Tsuda et al 2008).

En parallèle de la dysfonction protéosomale, les troubles de dégradation protéique peuvent être dus à un défaut de l'autophagie provenant d'une accumulation des mutants SOD1 et TDP-43 (Kabuta et al 2006, Wang et al 2010). Par ailleurs, l'expression de LC3-II, un constituant de l'autophagosome, est augmenté dans le modèle mSOD1 G93A et la **perte de TDP-43 diminue l'expression de autophagy related 7, atg7**, un gène impliqué dans l'autophagie (Bose et al 2011, Morimoto et al 2007).

L'avancée dans l'identification des gènes associés à la SLA a mis en évidence l'implication de nombreux gènes participant à l'autophagie. Des mutations de CHMP2B, une protéine impliquée dans la maturation de l'autophagosome et la dégradation endosome, ont été retrouvées dans des cas de SLA et de DFT (Parkinson et al 2006). Des mutations dans le gène **optineurine (OPTN)** également associé à la SLA (Maruyama et al 2010), dérégulent l'autophagie en altérant son rôle

dans la maturation de l'autophagosome et le recrutement de LC3 des mitochondries endommagées (Ying & Yue 2016). De plus, une déficience en OPTN diminue la formation de l'autophagosome (Bansal et al 2018). De façon très intéressante, une autre protéine associée à la SLA, TBK-1, peut agir sur OPTN et moduler l'autophagie. **TBK1** phosphoryle OPTN ce qui augmente son affinité avec LC3 et donc la clairance autophagique. Dans la SLA liée à la mutation de TBK1, TBK1 est incapable de se lier à OPTN et ne parvient plus à se déplacer vers les mitochondries endommagées (Richter et al 2016).

II.2.3. Propagation

Comme expliqué précédemment, la SLA est principalement caractérisée par la présence d'agrégats cytoplasmiques anormaux et des défauts de dégradation protéique. Cependant, malgré les nombreuses études concernant ces agrégats, plusieurs questions restent en suspens, notamment au sujet des mécanismes de la propagation de la protéinopathie.

Premièrement, les autopsies post-mortem montrent que la perte des NM inférieurs est **plus faible lorsque l'on s'éloigne du site d'apparition** de la maladie (Ravits et al 2007).

Deuxièmement, la **progression des signes cliniques** chez le patient confirme cette idée (Ravits & La Spada 2009). La SLA semble progresser à partir des zones atteintes vers la région adjacente.

Enfin, les lésions TDP-43 semblent se propager à partir d'un site initial (cortex moteur), le long des voies mono-sympathiques. Ceci suggère que la propagation clinique et neuropathologique pourrait être causée par une propagation de la protéine TDP-43 elle-même (Braak et al 2013).

Quelles sont les conséquences moléculaires et cellulaires de cette propagation ? Comment se produit ce phénomène ?

Il a été montré que les protéines mutées dans la SLA, telles que SOD1 et TDP-43 ou FUS, de part leur agrégation, peuvent entraîner un changement de conformation des partenaires qu'elles recrutent. Les mutants SOD1 se propagent également de la même façon qu'un prion, sans passer par un contact entre cellules (Munch et al 2011) et il a été montré que les agrégats de mSOD1 peuvent se transmettre de cellules à cellules et entraîner le mauvais repliement des protéines SOD1 sauvages. Cette propagation de mSOD1 dans les NM pourrait se produire grâce à la libération d'exosomes contenant mSOD1 notamment par les astrocytes (Basso et al 2013).

En 2016, l'étude d'Ayers et collaborateurs a confirmé la propagation de SOD1 mutée en utilisant un modèle animal pour la transmission motoneuronale (Ayers et al 2016). Une injection d'un homogénat spinal de souris SOD1 G93A est réalisée dans le nerf sciatique de souris SOD1 G85R mutée. Cette injection induit alors une dégénérescence des NM qui se propage le long du site d'injection. Les agrégats créés semblent aussi se répandre. Ils apparaissent tout d'abord dans les neurones injectés puis s'étendent rostralement. De la même façon, une astroglie se déclare premièrement dans la partie lombaire avant de s'étendre rostralement vers la partie thoracique et cervicale.

Cette étude, en accord avec l'étude de Bidhendi et collaborateurs en 2016, émet l'hypothèse qu'une protéine mal repliée peut entraîner un phénomène de propagation dans la SLA (Bidhendi et al 2016).

Concernant le mutant TDP-43, il a également la capacité de se répandre via les exosomes mais en plus il possède un domaine prion like dans la partie C terminale étant à l'origine de la formation de ses propres inclusions cytoplasmiques (Nonaka et al 2013).

Les inclusions de phospho TDP-43 (pTDP-43) dans le cortex cérébral pourraient alors se répandre dans le système nerveux central. Etant donné que les régions affectées dans la SLA sont souvent distantes les unes des autres, la dissémination de la maladie pourrait alors utiliser les projections neuronales. Le contact entre cellules se ferait donc par l'intermédiaire de ses projections. Il y aurait ensuite une conversion de pTDP-43 soluble en insoluble au sein des axones ce qui stopperait la progression de la maladie et ainsi bloquerait la propagation de TDP-43 (Braak et al 2013).

La capacité de propagation de FUS n'a pas encore été étudiée. Cependant il est connu que FUS possède un domaine prion like dans sa partie N-terminale et que les inclusions de FUS mutée ont la capacité d'entraîner l'agrégation de sa forme non mutée (Nomura et al 2014).

Bien que ces études soient parfois controversées, il semblerait que la maladie commence localement puis se répand de façon spatiotemporelle. Ainsi, déterminer le point départ de cette propagation permettrait de délimiter une zone à étudier pour l'élaboration d'un traitement curatif de la SLA.

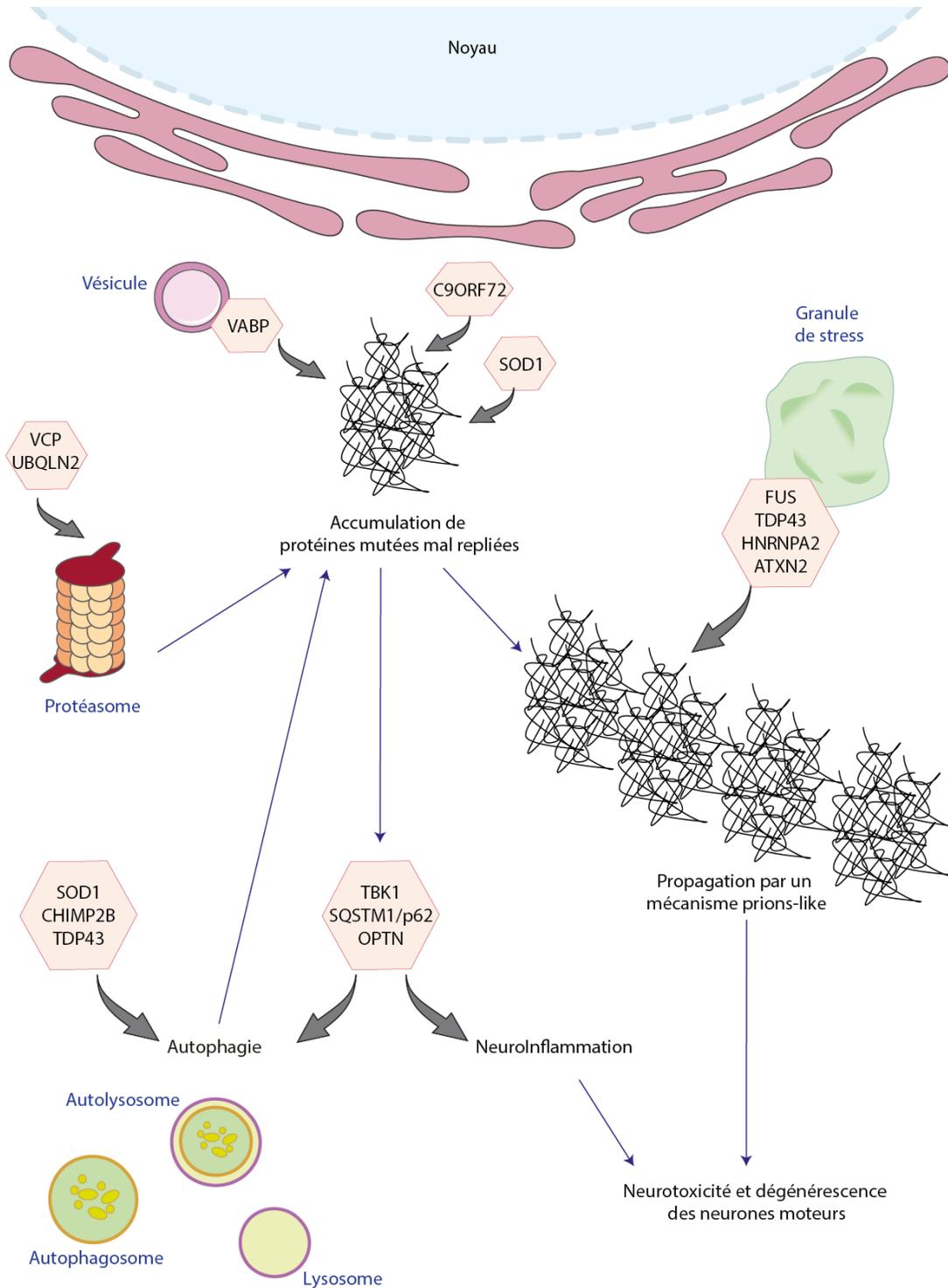


Figure 8 : Altération de l'homéostasie protéique dans la SLA

Les mutations de protéines associées à la SLA entraînent une altération du protéasome et de l'autophagie aboutissant à une accumulation des protéines dans le cytoplasme. L'augmentation de la concentration cytoplasmique en protéines mutées induira ensuite la formation d'agrégats capables de se propager par un mécanisme prion et ainsi entraîner une neurotoxicité et une dégénérescence des neurones moteurs (Adaptation de Brown et al 2017).

II.3. Métabolisme de l'ARN

De nombreux gènes liés à la SLA sont importants pour le métabolisme de l'ARN. FUS et TDP-43 sont des RBP (RNA-Binding Protein) impliquées dans la fabrication des microARN, l'épissage, la transcription, la traduction ou encore le transport de l'ARN (Lagier-Tourenne et al 2010, Lattante et al 2013).

Pour cela, FUS se lie à des ADN simples brins (Tan et al 2012) et aux ARNm tandis que TDP-43 se lie uniquement aux ARNm (Polymenidou et al 2011). En effet, il a été montré que FUS se lie à de très nombreux gènes dans le cerveau humain. FUS et TDP-43 se lient préférentiellement à des longs introns et à des séquences enrichies en GGUG (Lagier-Tourenne et al 2012). FUS est également capable de se lier aux petits ARN nucléaires (snARN) et aux ARNm dans leur région 3'UTR. Des interactions similaires entre protéines mutées dans la SLA ont été identifiées. Par exemple, TDP-43 est capable de se lier à l'ARNm de la progranuline et de FUS (Polymenidou et al 2011).

Ces liaisons aux ADN et ARN permettent à ces RBP de réguler la **transcription** (Tan et al 2012) et **l'expression génique**. La liaison de FUS aux longs introns module l'expression de gènes impliqués dans des maladies neurodégénératives. Par exemple, la déplétion de FUS induit une diminution de l'expression des longs ARN tels que le gène de microtubule-associated protein tau (*MAPT*) dont la mutation est associée aux démences frontotemporales (DFT). FUS agit aussi sur le gène heavy chains of neurofilament (*NEFH*) qui est associé à la maladie de Charcot Marie Tooth ou encore sur le gène *SOD1* associé à la SLA (Lagier-Tourenne et al 2012). Par ailleurs, une diminution de TDP-43 augmente l'ARNm de progranuline et diminue l'ARNm de FUS (Polymenidou et al 2011).

En plus d'une altération de la stabilité de l'ARNm, de **nombreux défauts d'épissages** ont été caractérisés suite à une perte de FUS ou TDP-43. Ainsi, la suppression de FUS entraîne un changement de plus d'une centaine d'événements d'épissage alternatif de gènes dans le cerveau (Lagier tourenne et al 2012). FUS régule aussi son propre épissage mais également celui d'autre ARN, notamment celui de l'exon 10 de *MAPT*. C'est pour cette raison que FUS joue donc un rôle important dans les mécanismes pathologiques liés à la DFT, l'augmentation de l'inclusion de l'exon 10 qui découle de la suppression de FUS favorisant l'apparition de cette

pathologie (Hutton et al 1998). Par ailleurs, HnRNP, une autre RBP impliquée dans la SLA, a un rôle crucial dans l'épissage. Elle contrôle plus de 1000 événements d'épissage. Pour cela, hnRNP a la capacité de se lier à de courtes séquences d'ARN (4-5 nucléotides) dans leur région 3' UTR (Huelga et al 2012).

Mais FUS et TDP-43 interviennent aussi après l'épissage, notamment au niveau du **transport des ARNm** entre le noyau et le cytoplasme. De plus, ces protéines sont présentes dans les granules de stress permettant le transport de l'ARN (Ayala et al 2008, Bosco et al 2010a, Dormann et al 2010). Plus précisément, il semblerait que le domaine RRM permette le recrutement des granules de stress. Une délétion de ce domaine empêcherait d'ailleurs la formation de ces granules (Colombrita et al 2009). Un autre domaine est également impliqué dans l'auto-assemblage et la formation d'agrégats : il s'agit du domaine de faible complexité (SYDG LC domaine) localisé dans la partie N-terminale de FUS. Plusieurs études ont montré qu'une mutation à l'intérieur de ce domaine contribue à la neurodégénérescence notamment en altérant la capacité de séparation de phase et la capacité agrégative de FUS (Matsumoto et al 2018, Monahan et al 2017).

De façon très intéressante, ces RBP interagissent ensemble pour perturber le métabolisme de l'ARN dans la SLA. En 2011, une collaboration entre ces deux acteurs a été identifiée dans le cadre de la SLA (Kabashi et al 2011). En effet, FUS et TDP-43 agiraient de façon parallèle sur leurs cibles (Lagier-Tourenne et al 2012). Par exemple, l'étude de Kim et collaborateurs en 2010 avait montré que FUS et TDP-43 forment un complexe régulant l'ARNm de HDAC6. TDP-43 serait également capable d'agir directement sur FUS en se liant à son 3' UTR et ainsi moduler son taux d'ARNm (Polymenidou et al 2011). Cette **synergie entre RBP** a été également observée par l'étude de Deshaies et collaborateurs en 2018 (Deshaies et al 2018). Ainsi, une déplétion nucléaire de TDP-43 augmente le nombre de transcrits HNRNPA1 avec l'exon 7B est inclus. Le taux protéique de cette isoforme, contenant un domaine prions like, est alors augmenté produisant ainsi une agrégation protéique et une toxicité cellulaire. Les RBP ont donc la capacité de se lier aux ARNm afin de réguler leur stabilité, leur épissage ou leur transport et cet effet est décuplé par une synergie entre RBP.

Cependant FUS et TDP-43 sont capables de réguler un autre type d'ARN, les microARNs. La perte de TDP-43 ou de FUS entraîne une diminution de la **fabrication de micro ARN** qui altère les mécanismes sous-jacents à ce type d'ARN. Par exemple, il a été montré que l'altération des microARN dans la SLA détériore la jonction neuromusculaire (Valdez et al 2014). L'implication de FUS durant la fabrication de micro ARN sera décrite de façon plus précise dans le chapitre suivant.

Les RBP jouent donc un rôle majeur dans l'altération du métabolisme lié à la SLA. Toutefois, **d'autres mutations de la SLA, qui ne sont pas des mutations de RBP, affectent ce métabolisme** à différents niveaux. Par exemple, les pré-ARNm contenant l'expansion de C9orf72 peuvent séquestrer des protéines de liaison à l'ARN empêchant ainsi l'épissage d'autres ARNm (Gascon & Gao 2014, Zhang et al 2015). L'étude de Freibaum et collaborateurs en 2015 a également identifié, grâce à des drosophiles portant une mutation C9ORF72, des défauts de transport de l'ARN associés à un défaut de l'enveloppe nucléaire et un défaut de l'export de l'ARN créant ainsi une rétention nucléaire de l'ARN et une altération de l'épissage.

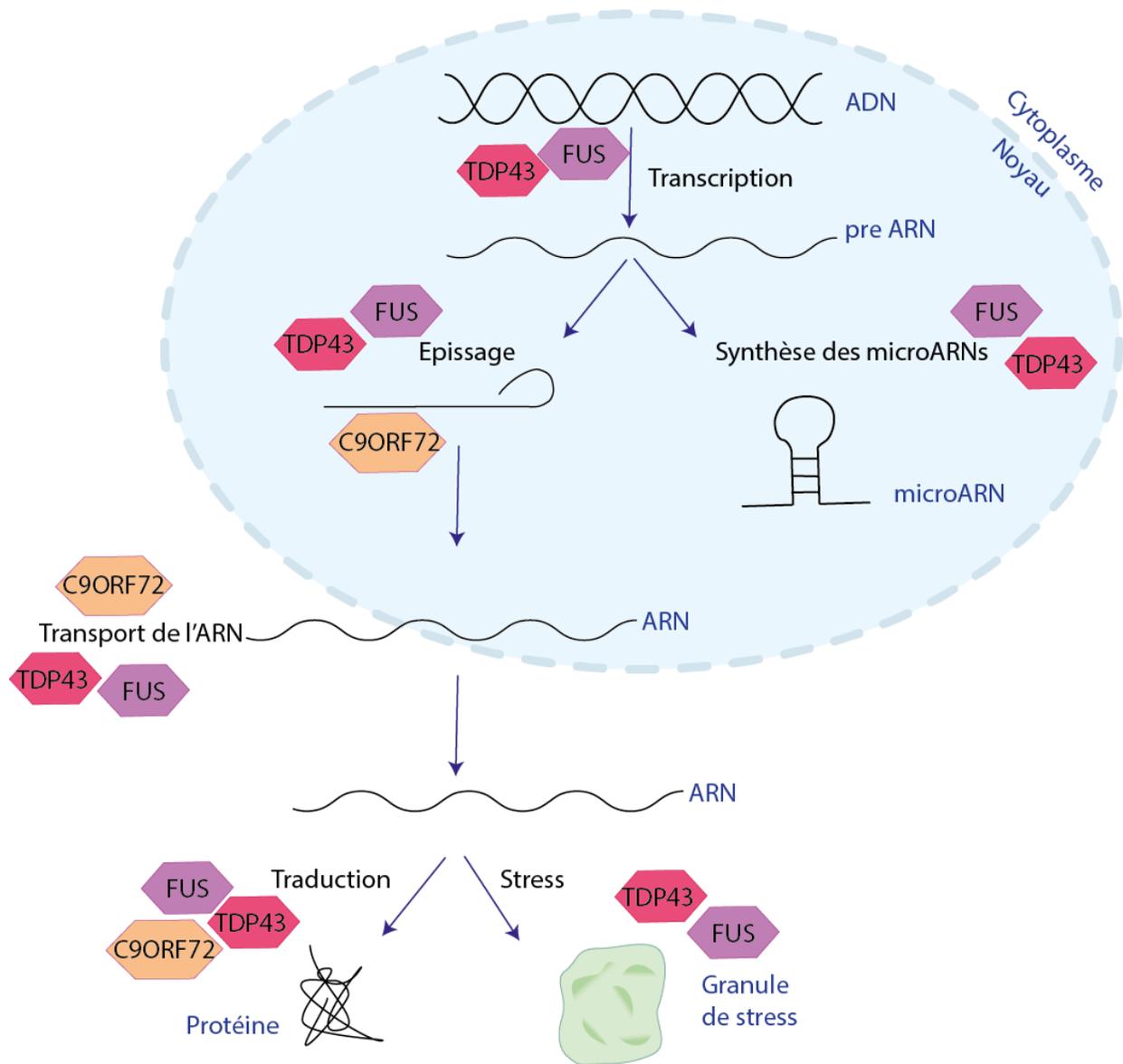


Figure 9 : Altération du métabolisme de l'ARN dans la SLA

Plusieurs mutations associées à la SLA touchent des RBP qui interviennent au niveau de différentes étapes du métabolisme de l'ARN. Ces protéines se lient à des ADN et participent à leur transcription mais aussi à des ARNm et des microARNs régulant ainsi leur synthèse et leur épissage. Grâce à leur capacité de naviguer entre le noyau et le cytoplasme, les protéines vont pouvoir transporter les ARNm et participer à la traduction et la formation de granules de stress.

II.4. Transport axonal et cytosquelette

Les neurones moteurs nécessitent un transport axonal important afin d'assurer le transport d'organites et des protéines du corps cellulaire à l'axone. Les éléments du cytosquelette jouent un rôle très important dans ce transport et tout dysfonctionnement pourrait avoir une conséquence dramatique sur la survie des neurones. Le cytosquelette est composé de microfilaments d'actine, de microtubules, de neurofilaments et des filaments intermédiaires ainsi que de dynéines, myosines et de kinésines.

Initialement, une **dérégulation du transport axonal** a été mise en évidence dans la SLA. Par exemple, l'étude de Zang et collaborateurs en 1997, a montré qu'une diminution de la tubuline et des neurofilaments dans les axones de la racine ventrale est associée à une altération du transport axonal chez les souris SOD1 (Zhang et al 1997). Plus précisément, les SLA liées aux mutations SOD1 présentent un **ralentissement du transport antérograde** (Williamson & Cleveland 1999) **et rétrograde** (Chen et al 2007b, Perlson et al 2009) avant la neurodégénérescence. Cela est associée aux altérations dans **la distribution des ARNm**. **En effet, les ARN neuronaux est régulée par TDP-43, FUS et hnRNPA1** (Huelga et al 2012, Lagier-Tourenne et al 2012, Polymenidou et al 2011). L'étude de Alami et collaborateurs en 2014 a montré qu'une altération du transport axonal des granules d'ARN est présente dans plusieurs modèles de SLA liée à la mutation *FUS* : chez la drosophile, dans une culture de neurones et dans des NM dérivés de patients SLA (Alami et al 2014).

Plus récemment, **plusieurs mutations des composants du cytosquelette** ont été observées dans la SLA. Des mutations du gène **dynactin**, impliqué dans le transport axonal le long du microtubule ont été détectées (Ferraiuolo et al 2011, Morfini et al 2009). En effet, une mutation de la dynactine 1 réduit le transport rétrograde dans les maladies des NM chez l'Homme (Gill et al 1991, Puls et al 2003). Par ailleurs, des mutations dans des gènes impliqués dans la polymérisation des axones ont été documentées. Il s'agit des gènes codant pour les neurofilaments à chaîne lourde (Figlewicz et al 1993, Al-Chalabi et al 1999), la périphérine PRPH et la profilin1 (Corrado et al 2011, Wu et al 2012). La présence de périphérine dans les inclusions ubiquitinées a notamment été détectée dans la moelle épinière de patients SLA (Leung et al

2004). De plus, les mutations de PFN1 inhibent l'excroissance axonale et leurs agrégats séquestrent TDP-43 inhibant ainsi ses fonctions. Cette **co-agrégation PFN1 et TDP-43** est expliquée par la présence de la partie C terminale de TDP-43 qui permet au mutant PFN1 sous forme insoluble de se lier et d'entraîner le recrutement et la phosphorylation de TDP-43 (Tanaka et al 2016, Wu et al 2012). Cette interaction entre PFN1 et TDP-43 suggère un rôle important du cytosquelette dans le mécanisme pathologique de la SLA.

L'identification de **nouveaux gènes de la SLA impliqués dans la formation du cytosquelette** a confirmé cette hypothèse: TUBA4A et KIF5A (Nicolas et al 2018, Pensato et al 2015). TUBA4A est essentielle à la formation de la structure axonale car elle est un des composants des microtubules tandis que KIF5A est un membre de la famille des kinésines et est impliqué dans le transport vésiculaire des protéines aux neurones. Tout ceci suggère un défaut axonal conséquent dans la maladie de Charcot. D'autres études ont montré que les **mutations dans les gènes du cytosquelette corrént avec la survie du patient**. Une augmentation de l'expression de kinesin-associated protein 3, KIFAP3 est observée dans un modèle de souris *Sod1^{G86R}* et corréle avec une diminution de la survie et la diminution de l'expression de ce gène chez les patients corréle avec une prolongation de la durée de la maladie (Dupuis et al 2000, Landers et al 2009). Une baisse de l'expression d'EPHA4 corréle avec une augmentation de la survie dans la SLA. Une explication possible est son action exubérante sur l'extension axonale (Van Hoecke et al 2012). De plus, les taux de neurofilaments dans le liquide céphalorachidien corrént négativement avec la survie (Ganesalingam et al 2013, Ganesalingam et al 2011). Ces diverses études ont montré l'importance du cytosquelette dans la pathologie. Cibler le cytosquelette dans la SLA pourrait alors s'avérer être une stratégie thérapeutique très intéressante.

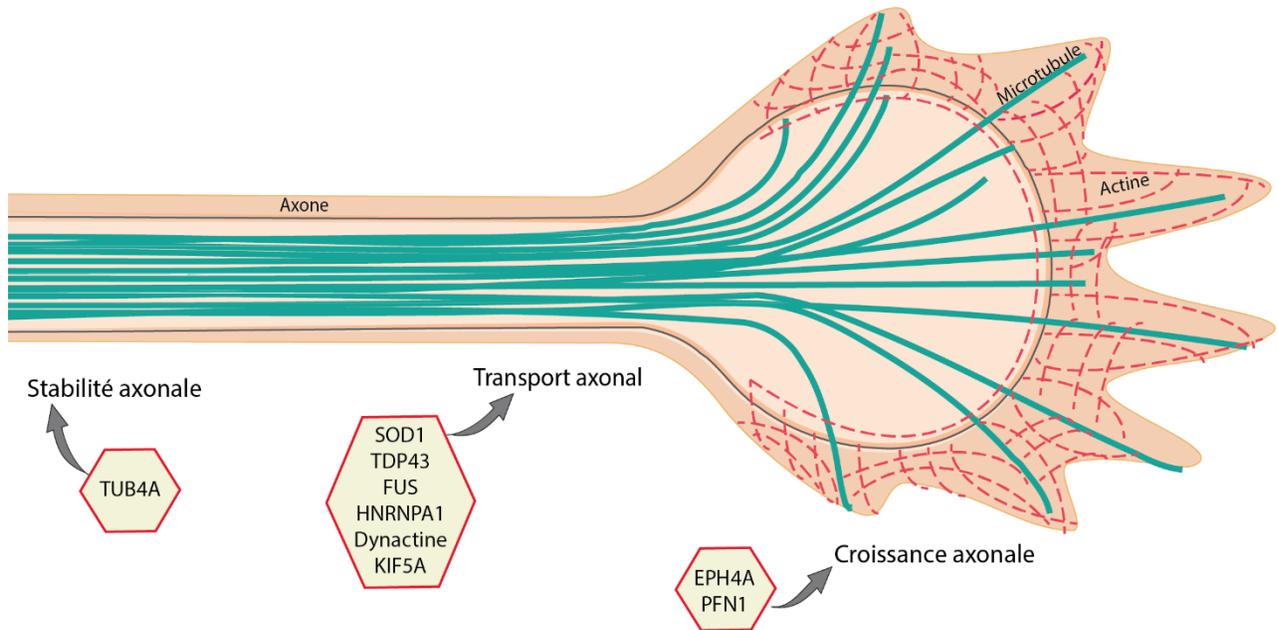


Figure 10 : Altération du cytosquelette dans la SLA

Les protéines associées à la SLA entraînent un ralentissement du transport antérograde et rétrograde. De plus, des mutations de la profiline 1 (PFN1), un gène impliqué dans la polymérisation des axones inhibe la croissance axonale. Enfin, de nouveaux gènes associés à la SLA ont montré leur implication dans la formation du cytosquelette. En effet, TUB4A, KIF5A et EPH4A agit respectivement sur la stabilité, le transport et la croissance axonale. Une altération du cytosquelette est donc présente dans la SLA.

II.5. Séparation en phase liquide

Les mécanismes pathologiques présentés précédemment ne sont pas exclusifs et peuvent fonctionner ensemble. Par exemple, un défaut du métabolisme de l'ARN peut être la conséquence de l'agrégation protéique. Il s'agit alors de savoir comment ces mécanismes convergent pour aboutir à la perte des NM. Une explication possible est la séparation en phase liquide. En effet, **l'altération de l'épissage, du protéasome ou encore de la dynamique du cytosquelette** peut être la conséquence **d'agrégats de protéines de liaison à l'ARN** caractéristiques de la SLA.

Ces agrégats proviennent d'une altération du métabolisme de l'ARN notamment d'un défaut de transport de l'ARN. Or, l'étude de Patel et collaborateurs en 2015 a montré que la **séparation en phase liquide est dépendante de la concentration en protéine de liaison à l'ARN** (Patel et al 2015). Cette accumulation cytoplasmique de TDP-43 ou FUS retrouvée dans la SLA pourrait donc entraîner la formation d'agrégats grâce à un mécanisme de séparation de phase liquide.

La séparation en phase liquide (LLPS, Liquid Liquid Phase Separation) est un mécanisme de désassemblage de deux liquides entraînant l'apparition de deux phases (Hyman et al 2014). De façon simplifiée, cela correspond à la séparation de l'huile et du vinaigre au sein d'une vinaigrette. Ce mécanisme est caractérisé par un diagramme de phases (miscible /non miscible) dépendant de la température et de la concentration. Une faible température et une concentration élevée seront favorables à la formation de deux phases. Physiologiquement, la LLPS est présente dans les organelles sans membrane tels que les granules de stress et nucléoli. Cela permet une sous compartimentation cellulaire rapide et réversible. Ceci permet une concentration de plusieurs composants en un même lieu pour faciliter les réactions cellulaires ou l'exclusion de certaines molécules.

Dans le cadre de la SLA, il a été montré que **le domaine à faible complexité (Low complexity domain LCD) est responsable de la séparation de phase des protéines TDP-43, FUS et hnRNPA1** (Lin et al 2015, Molliex et al 2015, Murakami et al 2015, Patel et al 2015). L'étude de Patel et collaborateurs en 2015 a montré que FUS peut former des compartiments liquides sphériques capable de fusionner entre eux pour former une sphère plus importante. Ces gouttelettes formées donnent lieu à des agrégats solides. Les mutations dans le domaine prion

like de FUS vont alors accélérer la conversion de liquide à solide. De plus, la **LLPS induite par le LCD de FUS est dépendante de la concentration en RBP**. Les agrégats détectés lors d'une mutation dans la NLS pourraient donc provenir de l'accumulation de FUS dans le cytoplasme. L'augmentation de la concentration de la protéine FUS déclencherait alors la LLPS qui entrainerait la conversion de ces phases liquides en des « phases » solides et finalement la formation d'agrégats.

L'étude de Molliex et collaborateurs en 2015 a permis d'aller plus loin dans ce mécanisme. In vitro, il a été montré que hnRNPA1, tout comme FUS, possède un LCD favorisant la séparation de phase liquide et entraînant la formation de gouttelettes riche en protéines. La nouveauté provient de la découverte de **l'implication du domaine de liaison à l'ARN (RRM)** dans l'apparition d'un mécanisme LLPS lors de la présence d'ARN. De plus, la mutation pathologique D262V n'impacte pas le mécanisme de séparation de phase retrouvé dans la forme sauvage de hnRNPA1, cependant, durant le processus de LLPS, une fibrillation se met en place dans la gouttelette liquide entraînant un **dépôt pathologique de fibrilles amyloïdes**.

Ces différentes études ont montré l'importance de la LLPS dans la SLA et la participation des domaines LCD et RRM dans ce processus. Toutefois, aucune information moléculaire ne sont connue quant au mécanisme guidant la LLPS de FUS. En 2018, l'étude d'Hofweber et collaborateurs a montré dans des cellules HeLa que la transportine (TNPO1) supprime la transition de phase de FUS et réduit le recrutement de FUS dans les granules de stress (Hofweber et al 2018). Par ailleurs, le motif RGG/RG de la partie C-terminale de FUS est crucial dans sa LLPS. La TNPO1 se lie à RGG3-PY en C-terminal afin d'empêcher la conversion soluble-insoluble. A l'inverse, une perte de la méthylation de l'arginine du domaine RGG3 de FUS favorise la LLPS et la formation de granules de stress. Enfin, il a été montré que la mutation P525L rend FUS moins sensible à l'action de TNPO1 ce qui favorise la LLPS. En conclusion cette étude a montré que la **LLPS de FUS est régulée par la méthylation de l'arginine et le récepteur de l'import nucléaire Transportin/Karyopherin-β2 (TNPO1/Kap β2)**. Ce mécanisme est dérégulé aussi bien dans la SLA, caractérisée par une mutation dans la NLS de FUS que dans la DFT qui présente une perte de la méthylation de l'arginine. De façon générale, une perturbation de la LLPS pourrait être le point de départ des maladies causées par les protéines de liaison à l'ARN.

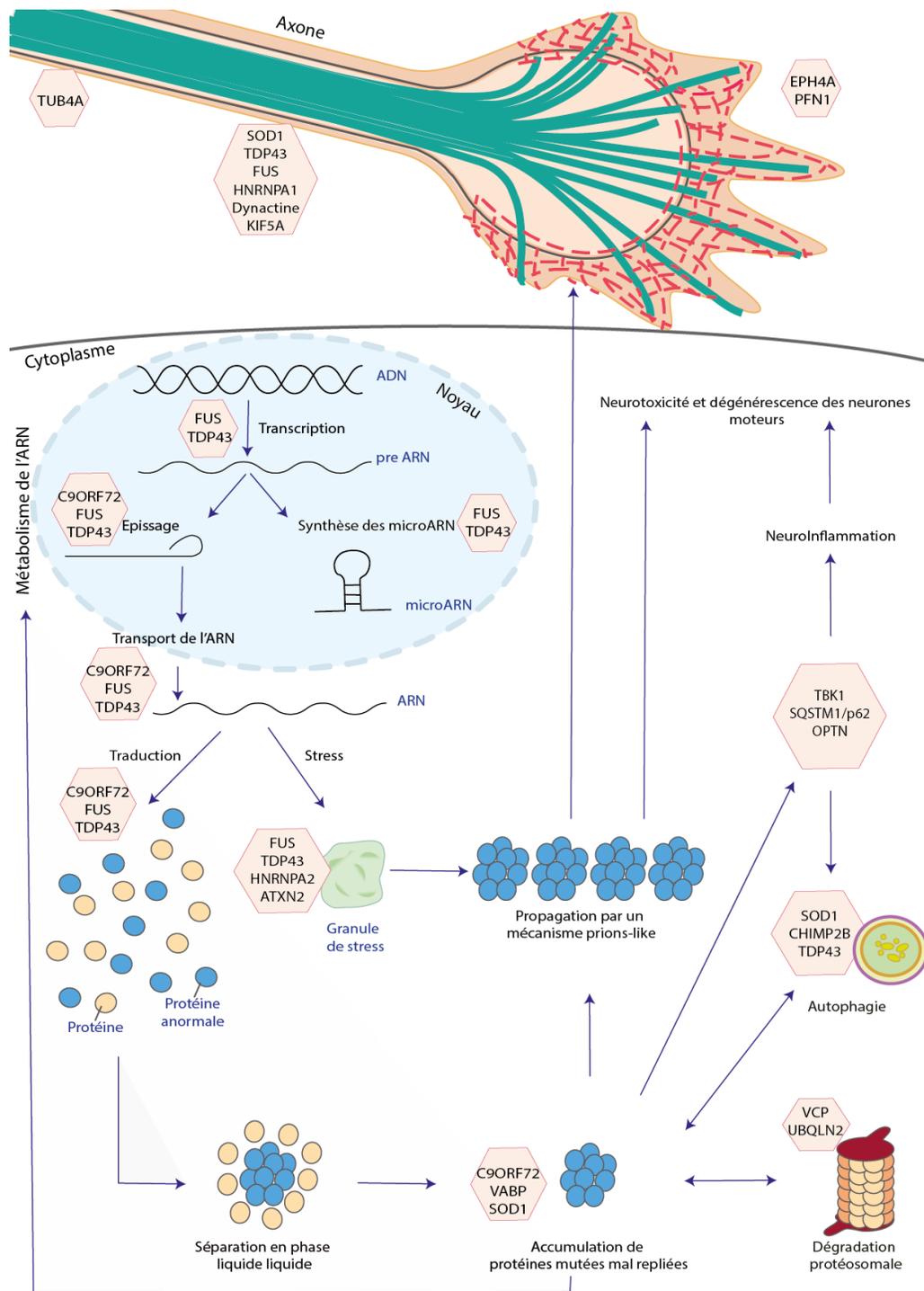


Figure 11 : Mécanismes pathologiques impliqués dans la SLA

Les mécanismes expliqués précédemment pourraient converger vers un mécanisme de séparation en phase liquide-liquide (LLPS). En effet, l'accumulation des protéines dans le cytoplasme causerait la LLPS puis la formation d'agrégats qui altérerait le métabolisme de l'ARN, les fonctions protéiques et le cytosquelette

III. SLA : une maladie multicellulaire

La SLA a longtemps été considérée comme une maladie intrinsèque aux NM cependant l'utilisation de différents modèles notamment de modèles conditionnels de SLA a permis d'étudier la contribution des autres types cellulaires. L'implication des NM, des microglies, des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones sérotoninergiques est détaillée dans cette partie. Par la suite, une partie sera consacrée à la discussion de la contribution du muscle dans la SLA.

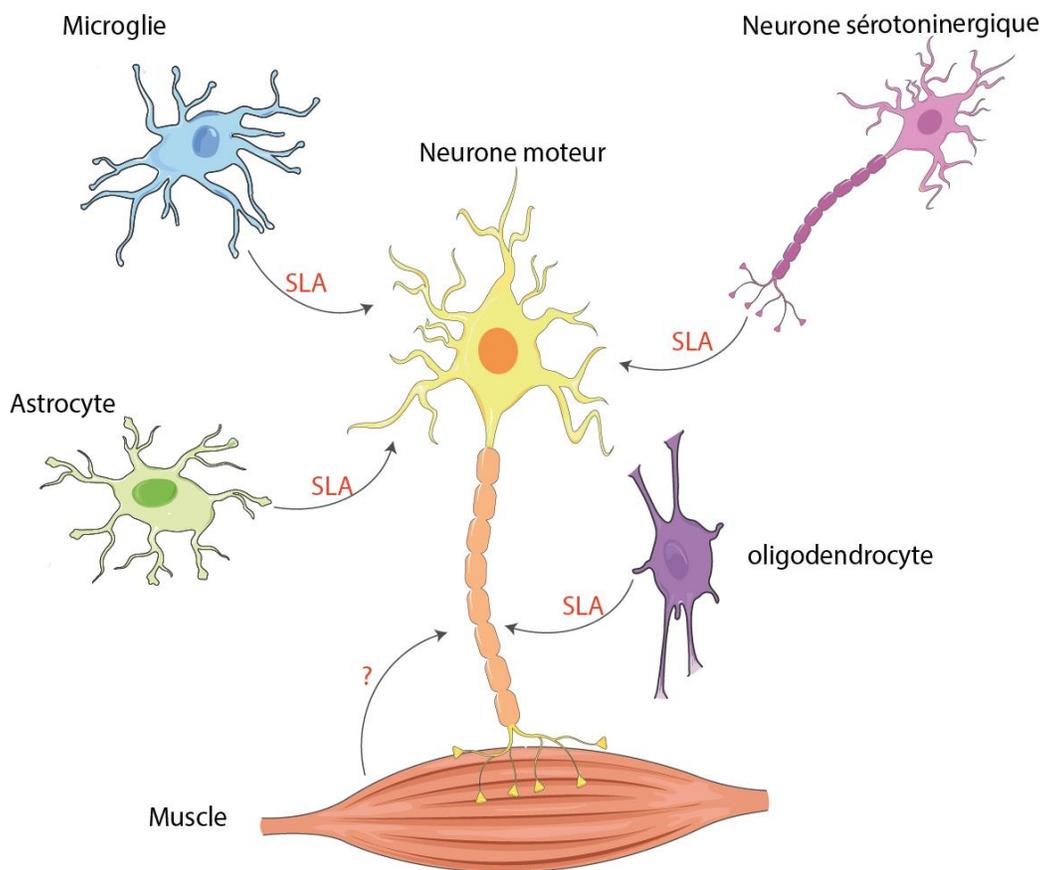


Figure 12 : La SLA est une maladie multicellulaire

La SLA est caractérisée par l'atteinte des neurones moteurs, cependant plusieurs études ont montré l'implication d'autres types cellulaires. En effet, les microglies, les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones sérotoninergiques contribuent à la SLA. De façon très étonnante, le rôle actif du muscle dans la pathologie reste à définir.

III.1. Neurones moteurs

La sclérose latérale amyotrophique est décrite comme une maladie des NM supérieurs et inférieurs. Les NM subissent la maladie tout en y contribuant (Jaarsma et al 2008). En effet, la SLA induit une dégénérescence des neurones moteurs associée à une activation de la cascade des caspases, une altération des canaux ioniques potassiques, une hyperexcitabilité axonale ou encore une hyperpolarisation membranaire (Bruijn et al 2004, Kanai et al 2006, Vucic & Kiernan 2006, Vucic et al 2007). Cependant, les avancées scientifiques ont permis de mieux décrire les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la SLA et ont notamment permis d'identifier les populations cellulaires impliquées dans la maladie. Plusieurs études ont montrées que **la surexpression de SOD1 mutée spécifiquement dans les neurones moteurs n'est pas suffisante pour induire la SLA** (Lino et al 2002, Pramatarova et al 2001). Cependant, il est tout de même établi que la toxicité de SOD1 dans les NM contribue à la SLA. En 2006, Boillée et collaborateurs ont montré que des souris avec une mutation conditionnelle de $SOD1^{G37R}$ dans tout l'organisme présentent une perte de poids, une dénervation et une atrophie musculaire (Boillee et al 2006). Les souris $SOD1^{G37R}$ sont ensuite croisées avec des souris exprimant la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur motoneuronal, Islet-1. Cela induit alors une diminution du mutant SOD1 dans les NM qui retarde l'apparition de la SLA et étend la survie de 64 jours. **La SOD1 dans les NM participe donc bien au déclenchement de la maladie.** Cela a été confirmé par Wang et collaborateurs en 2008 montrant que **la SLA est en partie due à la toxicité de SOD1 dans les NM.** En effet, l'expression du mutant SOD1 spécifiquement dans les NM et interneurons entraîne une perte de poids, une diminution du nombre de NM dans la moelle épinière et une diminution du nombre d'axones dans la couche 5 de la racine antérieure du NM.

Des résultats similaires ont été obtenus pour TDP-43 et FUS. Ditsworth et collaborateurs en 2017 ont montré que **le mutant TDP-43 au sein des NM gouverne l'apparition de la maladie mais pas sa progression.** Les souris présentant une mutation TDP-43 présentent un déficit moteur à 3 mois tandis que celles présentant une réduction de TDP-43 dans les NM n'ont toujours pas de problème moteur à 10 mois. A un stade tardif de la maladie, la réduction de TDP-43 spécifiquement dans les neurones n'est plus suffisante pour protéger les JNM, empêcher les défauts axonaux et maintenir les performances comportementales.

En 2017, Scekcic-Zahirovic et collaborateurs, ont étudié la toxicité de FUS mutant dans les NM (Scekcic-Zahirovic et al 2017). Pour cela, un modèle murin possédant une mutation conditionnelle supprimant la séquence de localisation nucléaire de FUS (Δ NLS) a été utilisé. Chez ces souris, l'allèle porteur de la mutation Δ NLS est flanqué de deux séquences loxP, et la recombinaison par la Cre recombinase au niveau de ces sites loxP permet une restauration de la séquence de localisation nucléaire (NLS) et de la localisation nucléaire de FUS. Le croisement avec des souris exprimant la Cre sous le contrôle du promoteur ChAT restaure donc l'expression de FUS sauvage dans les NM tandis que le reste de l'organisme présente la mutation Δ NLS. Il a été montré que le rétablissement de FUS sauvage (qui exprime à nouveau le domaine NLS) dans les NM de souris homozygotes, ne module pas la survie des souris. De plus, les fonctions motrices ne sont pas restaurées chez les souris hétérozygotes malgré la présence de NM normaux.

Dans la SLA, il est reconnu qu'une atteinte conjointe des NM supérieurs et inférieurs est nécessaire à l'apparition de l'altération de la motricité, d'une paralysie progressive ou encore du décès du patient. Etonnement, l'importance de l'implication des NM supérieurs dans la SLA est très peu décrite. A l'heure actuelle, il est connu que les NM supérieurs dégénèrent et perdent leurs axones au court de la SLA (Ozdinler et al 2011, Zang & Cheema 2002) et qu'une hyperexcitabilité est présente dans cette population neuronale (Fogarty et al 2015, Saba et al 2016). De plus, le lien génétique entre DFT et SLA, mais également l'apparition de symptômes communs suggèrent une origine corticale de la maladie. Toutefois, **la contribution des NM supérieurs au déclenchement de la SLA reste encore à étudier**. Deux études du laboratoire tentent actuellement de répondre à cette question. L'étude de Marques et collaborateurs en préparation, caractérise les mécanismes pathologiques qui sous-tendent la dégénérescence des NM supérieurs grâce à une purification et isolation de ce type neuronal tandis que l'étude de Burg et collaborateurs étudient la toxicité de ces NM en réalisant une diminution de l'expression de SOD1 mutant spécifiquement dans les NM supérieurs.

Toutes ces études ont montré que les NM font partie intégrante du processus pathologique lié à la SLA. Cependant, la toxicité des NM uniquement ne suffit pas pour causer la SLA. L'implication d'autres types cellulaires est donc importante dans la maladie. Dans un premier temps, la contribution des cellules voisines des NM a été étudiée puis la question d'une atteinte périphérique a été amenée dans la maladie. Notamment le rôle actif ou passif du muscle dans la SLA a fait l'objet de nombreuses questions qui feront l'objet d'une partie entière dans ce chapitre de thèse.

III.2. Cellules gliales

Les astrocytes, microglies et oligodendrocytes sont les cellules gliales majeures du système nerveux central. La neuroinflammation est caractérisée par l'activation de ces cellules.

Les premières hypothèses de la contribution de la neuroinflammation dans la SLA proviennent de l'observation d'une augmentation du taux de prostaglandines E2 dans le liquide céphalorachidien des patients SLA (Almer et al 2002) et d'une augmentation de l'expression de COX2 dans la moelle épinière des patients et souris SLA (Almer et al 2001, Yasojima et al 2001). L'hypothèse a été validée en s'appuyant sur des études montrant que l'inhibition de COX2 améliore la survie des souris SLA (Drachman et al 2002, Pompl et al 2003).

Par la suite, la neuroinflammation a été observée dans les tissus de patients prélevés en post mortem et dans les tissus de souris SLA (Brites & Vaz 2014, Corcia et al 2012).

La contribution de ces trois types cellulaires a donc été étudiée dans la SLA.

III.2.1. Microglies

Les microglies sont des cellules pouvant acquérir aussi bien une fonction pro-inflammatoire qu'anti-inflammatoire. Dans la SLA, il a été montré qu'un stade pro-inflammatoire est présent en fin de maladie suivi d'un passage de cet état pro inflammatoire vers un état anti-inflammatoire. La neuroprotection est donc diminuée en stade final de la maladie provoquant ainsi l'inflammation. En effet, une altération de la libération de cytokines, une surexpression des marqueurs microgliaux (CD11b, Iba1) et des chimiokines a été observée chez les souris

présentant une mutation SOD1 en stade final de la maladie (Corcia et al 2012, Henkel et al 2006, Henkel et al 2004, Liao et al 2012, Meissner et al 2010, Nguyen et al 2001).

L'implication de la microglie a également été caractérisée à l'aide d'un knock down de SOD1 dans la microglie grâce à un système CRE lox. Pour cela, des souris présentant une mutation conditionnelle de SOD1^{G37R} dans tout l'organisme ont été croisées avec des souris exprimant la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur CD11b. **La diminution de la toxicité microgliale de SOD1 a rallongé la survie des souris** de 99 jours, cependant l'activation microgliale reste inchangée (Boillee et al 2006).

En 2016, El Oussini et collaborateurs ont identifié une partie du mécanisme pathologique lié aux microglies (El Oussini et al 2016). Lors d'une étude focalisée sur le rôle du récepteur 5HT2B dans la SLA, il a été montré que l'expression de ce récepteur 5HT2B affecte la progression de la SLA aussi bien chez le patient que les souris SLA. Le croisement des souris SOD1 mutée avec des souris knock-out pour le récepteur 5HT2B raccourcit la survie de 30% chez les souris SLA. Ce récepteur est surexprimé dans les microglies et est requis pour l'activation des phagocytes mononucléaires durant la SLA. L'absence de récepteur 5HT2B est alors associée à une dégénérescence des phagocytes mononucléaires de la moelle épinière et une accélération de la progression de la maladie mais ne modifie pas son apparition. **Les récepteurs 5HT2B via leur expression dans la microglie joueraient donc un rôle important dans la progression de la SLA.**

III.2.2. Astrocytes

De la même façon que pour la microglie, la contribution des astrocytes a été étudiée. Il a été montré que la surexpression de SOD1 mutée spécifiquement dans les astrocytes, quant à elle, est capable d'induire la mort des NM spinaux dans la SLA (Nagai et al 2007).

A l'inverse, plusieurs études ont caractérisé l'effet d'une diminution de la mutation dans les astrocytes. Le knock down de SOD1^{G37R} mutée dans les astrocytes entraîne un ralentissement de la progression de la maladie de 14 jours en stade précoce et de 48 jours en stade tardif. De plus, la diminution du mutant SOD1 dans les astrocytes entraîne une inhibition de l'activation des microglies (Yamanaka et al 2008).

Cette observation a été confirmée par l'étude de Wang et collaborateurs en 2011, montrant que la réduction de SOD1^{G85R} spécifiquement dans les astrocytes retarde l'apparition de la SLA d'une vingtaine de jours et ralentit la progression de la maladie. En effet, la perte de NM apparaît plus tôt chez les souris SOD1^{G85R} que chez les souris où la mutation est supprimée des astrocytes. Enfin, l'activation microgliale est diminuée et l'expression du transporteur du glutamate (GLT-1) est préservée chez ces souris (Wang et al 2011).

Les astrocytes entraînent l'apparition et participent à la progression de la maladie mais ne suffisent pas à eux seuls pour l'induire.

III.2.3. Oligodendrocytes et cellules de Schwann

Il est intéressant de noter que les oligodendrocytes et les cellules de Schwann, responsables de la fabrication de la gaine de myéline respectivement dans le système nerveux central et périphérique, sont également affectés dans la SLA. Chez les patients SLA, une pâleur myélinique a été constatée ainsi qu'une perte du nombre de fibres suite à une lésion de la moelle épinière. La myéline est également moins compacte et présente moins de lipides chez le patient (Hayashi et al 2001).

Des études plus récentes chez le rongeur ont confirmé l'atteinte des oligodendrocytes dans la SLA. L'étude de Niebroj-Dobosz, a montré une dégénérescence de la gaine de myéline en stade symptomatique chez le rat possédant une mutation SOD1 (Niebroj-Dobosz et al 2007). L'étude de Scekcic-Zahirovic décrit une **altération de la structure et de la fonction de la myéline ainsi qu'une altération des oligodendrocytes dans la moelle épinière dans les souris *Fus* ΔNLS** (Scekcic-Zahirovic et al 2017).

En 2013, il a été rapporté que les oligodendrocytes sont altérés chez des souris surexprimant SOD1^{G93A}. Un déficit de la myéline dans la substance grise de la moelle épinière chez ces souris SLA ainsi qu'une dégénérescence des oligodendrocytes a été constatée chez les souris transgéniques. De plus, les cellules gliales NG2+, qui sont les progéniteurs des oligodendrocytes, sont altérées dans les régions du cerveau où les NM ont dégénéré lors de la SLA. La deuxième partie de cette étude a montré que la délétion de SOD1 mutée dans les oligodendrocytes

retarde la maladie de 62 jours et diminue l'astrocytose et l'activation microgliale (Kang et al 2013). **Les oligodendrocytes contribueraient en partie au phénotype observé dans la SLA.**

Concernant les cellules de Schwann, leur rôle dans la SLA reste très controversé. Certaines études sont en faveur d'une implication de ces cellules dans la SLA, comme l'étude de Perrie et collaborateurs montrant la présence de défauts myéliniques au niveau du système nerveux périphérique chez les patients SLA traduisant une altération des cellules de Schwann (Perrie et al 1993).

L'étude de Lobsiger et collaborateurs en 2009, confirme le rôle des cellules de Schwann dans la SLA en montrant que **la suppression de la mutation de SOD1 dans les cellules de Schwann accélère la progression de la maladie** (Lobsiger et al 2009).

Cependant, l'étude de Turner et collaborateurs en 2010 a montré que l'accumulation de SOD1 mutée dans les cellules de Schwann n'est pas pathologique, contrairement à son accumulation dans les astrocytes et les microglies observée dans la SLA (Turner et al 2010). Des souris surexprimant SOD1^{G93A} sous le contrôle du promoteur P0-Cx32 exclusif des cellules de Schwann préservent la fonction motrice et la survie des souris. De plus, aucune modification de l'apparition de la SLA et aucune perte des NM n'a été détectée. **La surexpression de SOD1 G93A dans les cellules de Schwann, indépendamment des autres types cellulaires, serait incapable de moduler la maladie.**

Des défauts myéliniques existent donc dans la SLA mais pour conclure à une éventuelle contribution des cellules de schwann, des études complémentaires sont nécessaires.

III.3. Neurones sérotoninergiques

La SLA est cliniquement caractérisée par une paralysie progressive, une spasticité et une perte de poids entraînant le décès du patient dans les trois ans suivant le diagnostic. Actuellement, son traitement repose sur l'utilisation du riluzole, un inhibiteur des récepteurs du glutamate. Or, les neurones sérotoninergiques qui innervent les neurones moteurs, présentent un rôle dans la régulation de la locomotion (Antri et al 2002, Jacobs 1976, Ribeiro-do-Valle et al 1991) mais aussi dans la régulation de l'excitabilité glutamatergique (McCall & Aghajanian 1979, Nedergaard et al 1987).

Dans la SLA, une diminution du tryptophane, un précurseur de la sérotonine (5HT), a été constaté dans le liquide cérébro spinal et dans le plasma de patients SLA (Monaco et al 1979). Le taux de 5HT et de 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA), un métabolite urinaire de la 5HT, chez le patient a été investigué dans la moelle épinière par deux équipes présentant des résultats contradictoires. Bertel et collaborateurs en 1991 ont montré un taux normal de 5HT et une diminution de 5HIAA chez le patient tandis que Forrest et collaborateurs en 1996 ont montré un taux normal de 5HT et une augmentation de 5HIAA chez le patient (Bertel et al 1991, Forrest et al 1996). Ces résultats contradictoires peuvent être liés à la fragilité de la 5HT qui la rend très compliquée à étudier du fait de sa dégradation en quelques heures suivant l'autopsie (Yoshimoto et al 1993).

Cependant, Dupuis et collaborateurs en 2010 ont montré que la survie des patients SLA était corrélée au taux de sérotonine plaquettaire (Dupuis et al 2010).

En 2013, Dentel et collaborateurs ont associé la dégénérescence des neurones sérotoninergiques à la spasticité constatée dans la SLA. Ces auteurs ont également observé une perte de neurones 5HT dans le tronc cérébral de patients SLA. De plus, une atrophie des corps cellulaires des neurones 5HT, une dégénérescence des projections des neurones 5HT ainsi qu'une baisse du taux de 5HT dans le cervelet et la moelle épinière ont été observés chez les souris *Sod1^{G86R}*. (Dentel et al 2013).

Plus récemment, El Oussini et collaborateurs ont montré que les récepteurs 5-HT_{2B} ralentissent la progression de la maladie et empêchent la dégénérescence des phagocytes mononucléaires de la moelle épinière (El Oussini et al 2016). En 2017, El Oussini et collaborateurs ont montré qu'une suppression sélective de la protéine SOD1 mutée dans les neurones sérotoninergiques prévient la spasticité des souris en phase terminale et bloque l'activité constitutive des sous unités 5HT_{2B} et C ayant pour conséquence une aggravation du déficit moteur et une accélération de l'apparition de la maladie (El Oussini et al 2017).

Les neurones sérotoninergiques, grâce à leur régulation de la spasticité, semblent donc compenser le déficit moteur et maintenir les fonctions motrices dans la SLA.

Chapitre 2: Muscle Squelettique et rôle dans la SLA

Le corps humain possède plus de 600 muscles squelettiques, représentant environ 40% de la masse corporelle. Afin d'assurer la locomotion, la respiration, la thermogénèse ou encore la régulation du métabolisme lipidique et glucidique. Les muscles sont répartis en deux familles : les muscles lisses et les muscles striés, eux-mêmes divisés en deux classes, les muscles striés squelettiques et cardiaque. Les muscles lisses se contractent de façon spontanée suite à une activité électrique tandis que les muscles striés se contractent sous l'action du nerf. Dans la SLA, seul le muscle strié squelettique est atteint. Cette partie sera donc consacrée au muscle strié squelettique.

I. Structure du muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique est un ensemble de faisceaux de fibres musculaires recouvert de tissus conjonctifs appelé **fascia** ou **aponévrose**. Cette enveloppe maintient le muscle, en le rigidifiant et en le fixant à l'os, et impose le sens de la contraction. Le maintien du muscle est également assuré par trois couches successives.

L'**épimysium** se situe directement sous l'aponévrose et englobe plusieurs faisceaux musculaires. Le **périmysium**, quant à lui, délimite chaque faisceau en regroupant 10 à 100 fibres musculaires. Entre chaque fibre, les fibroblastes sécrètent du collagène formant une fine matrice : l'**endomysium**.

Toutes ces membranes permettent l'apport de collagène jusqu'aux **fibres musculaires** (Jones et al 2005, Tortora & Grabowski 1994).

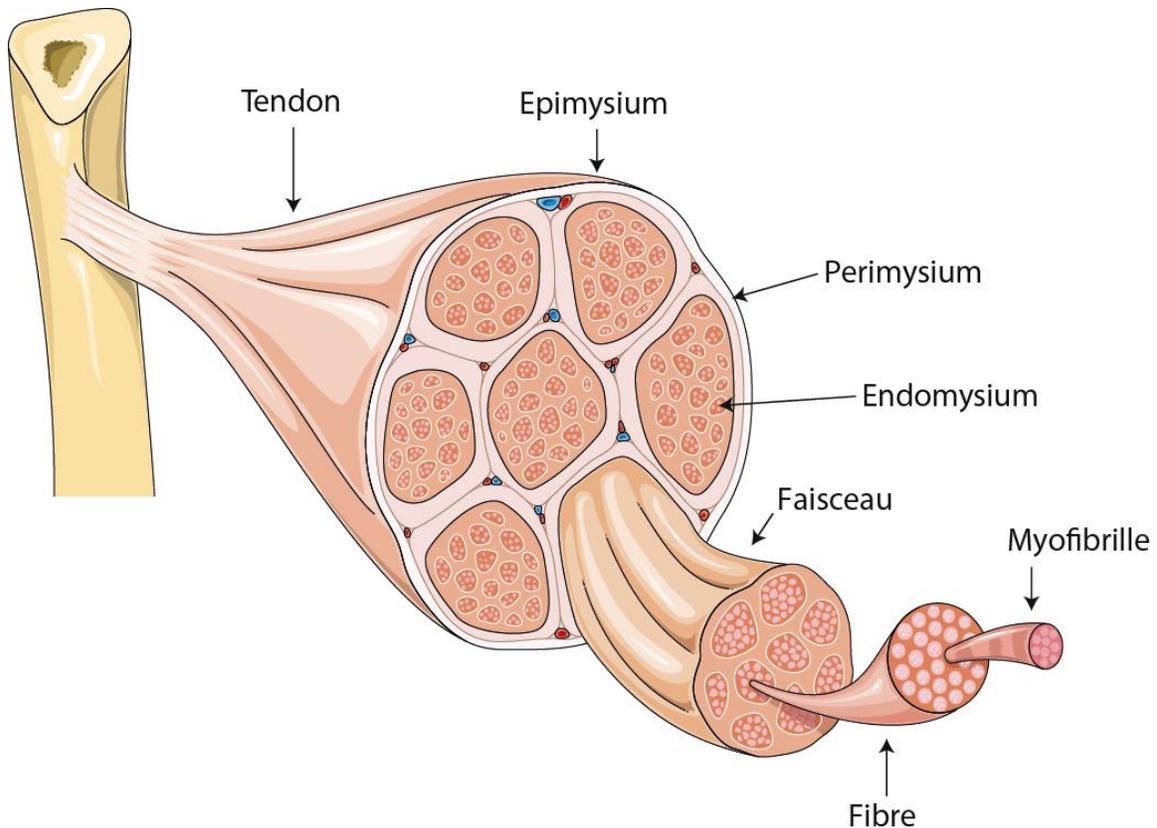


Figure 13 : Structure du muscle strié squelettique

Le muscle squelettique est constitué de plusieurs faisceaux musculaires maintenus par trois couches successives : l'épimysium, le périmysium et l'endomysium. Un faisceau musculaire est composé de plusieurs fibres, elles-mêmes constituées de plusieurs myofibrilles.

II. Structure et développement d'une fibre musculaire

Les fibres musculaires ou myocytes sont de très longues cellules plurinucléées de forme cylindrique disposées de façon parallèle. Leur diamètre est de $50\mu\text{m}$ et elles peuvent atteindre jusqu'à 30 cm de longueur. Ces cellules proviennent d'une **succession de fusions cellulaires** à partir de cellules non différenciées, les myoblastes. **L'aboutissement de ces fusions est la création de fibres musculaires matures constituées de myofibrilles** qui participent à la contraction du muscle grâce aux protéines contractiles : l'actine et la myosine. Selon le type de fibres présentes, la vitesse de contraction et les propriétés métaboliques seront différentes.

II.1. Différents types de fibre

Chez les mammifères, il existe plusieurs types de fibres qui sont classées en trois catégories selon la vitesse de contraction et la résistance à la fatigue.

Les **fibres type I** sont oxydatives et lentes, leur durée de contraction est comprise entre 75 et 100 ms. La présence de nombreuses mitochondries permet la contraction continue et la résistance à la fatigue. De plus, ces fibres sont très riches en myoglobine ce qui leur donne un aspect rouge.

Les fibres de type II ont un diamètre plus important, une durée de contraction plus courte de 7,5 ms, beaucoup moins de mitochondries et une plus faible capacité pour générer l'ATP nécessaire à la contraction. Elles sont divisées en deux groupes, les **fibres de type IIa** sont rapides, oxydatives et glycolytiques, riches en myoglobine. Les **fibres de type IIb** à secousses rapides sont uniquement glycolytiques et pauvres en myoglobine. C'est ce qui leur donne leur aspect blanc (Schiaffino & Reggiani 2011).

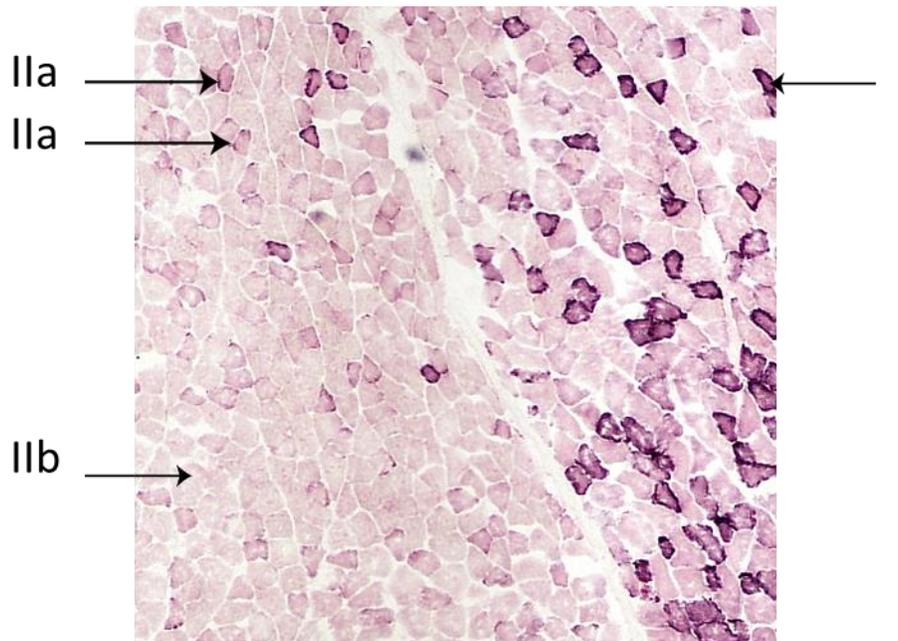


Figure 14 : Présentation des différents types de fibres dans le muscle gastrocnémien marqué à la succinate déshydrogénase.

Le muscle squelettique est constitué de plusieurs types de fibres musculaires. Les fibres oxydatives et lentes de type I, les fibres rapides, oxydatives et glycolytiques de type IIa et les fibres rapides uniquement glycolytique de type IIb.

II.2. Anatomie des myofibrilles

Le **sarcolemme** composé de la **membrane plasmique** et la **lame basale** enveloppe les myofibrilles. Celles-ci sont des cellules cylindriques (diamètre de 1 à 2 μm) entourées de réticulum sarcoplasmique. Par intervalles réguliers, le **réticulum sarcoplasmique**, qui est un stockeur de calcium, est coupé par des invaginations du sarcolemme qui correspondent aux **tubules T**.

A l'intérieur de ce réseau se trouve la myofibre composée de protéines contractiles, protéines de structure et de protéines régulatrices. Leur apparence striée provient de l'alternance de bandes sombres, appelées **Bande A** et de bandes claires appelées **Bande I**. Au milieu de la bande A se trouve la **ligne M** ainsi que la bande la plus claire appelée la **bande H**. La ligne très foncée entre deux bandes I correspond à la **ligne Z**. L'espace entre deux lignes Z successives est appelé le **sarcomère**.

Le sarcomère, qui mesure 2,2 μm chez l'adulte au repos, est composé de filament fins d'**actine** situés dans la bande I et de filament épais de **myosine** présent dans la bande A. Dans la bande A se trouve donc une **zone de chevauchement** avec 6 filaments d'actine entourant un filament de myosine et 3 filaments de myosine entourant 1 filament d'actine. Ce chevauchement permet le **glissement de l'actine sur la myosine, à l'origine de la contraction du muscle**.

L'actine est une petite protéine globulaire de 42 000 Da tandis que la myosine est composée de 2 chaînes lourdes de 200 000 Da et de 4 chaînes légères de 20 000 Da. Les chaînes légères de la myosine lient le calcium et contrôlent l'activité de la myosine.

Les protéines régulatrices : la tropomyosine et la troponine régulent la contraction du muscle. La **tropomyosine** bloque la liaison de la myosine à l'actine tandis que la troponine est composée de 3 sous-unités, chacune ayant des caractéristiques spécifiques. La **troponine C** se lie au calcium, la **troponine I** inhibe le glissement de l'actine sur la myosine et la troponine T permet l'interaction entre la troponine C, la troponine I et l'actine.

Enfin, des protéines de structure maintiennent la structure de la myofibrille. Par exemple, la **titine** et la **desmine** stabilisent le sarcomère, la **nébuline** et l' **α actinine** lient les filaments d'actine et la **dystrophine** ancre l'appareil contractile au sarcolemme (Jones et al 2005).

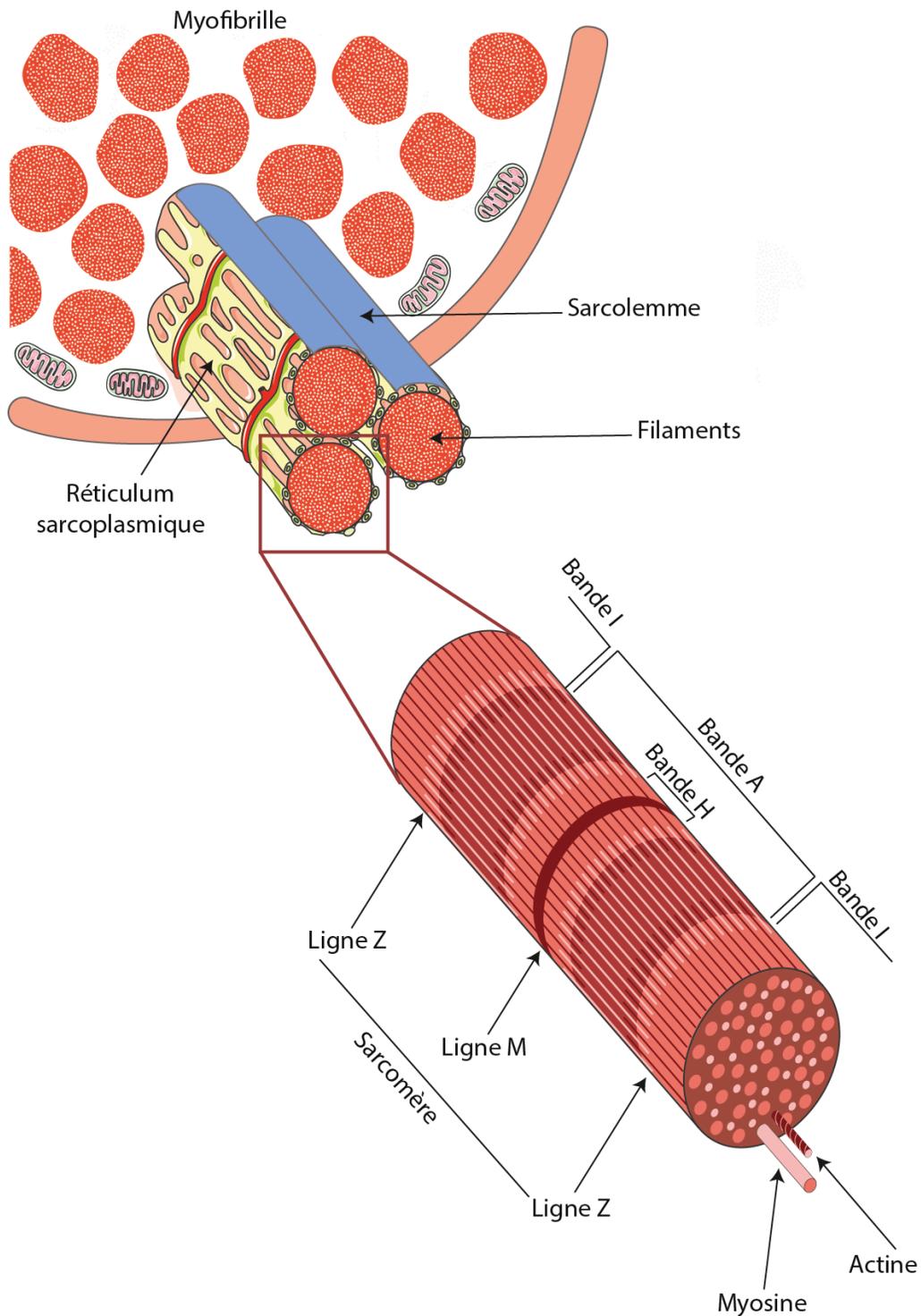


Figure 15 : Structure d'une myofibrille

Le sarcolemme et le réticulum sarcoplasmique enveloppent les myofibrilles composées de filaments d'actine et de myosine. L'alternance d'actine et de myosine donne un aspect strié aux myofibrilles. Les bandes A et I représentent respectivement les bandes sombres et claires. Au sein de la bande A se trouve la ligne M et la Bande H tandis que dans la Bande I se trouve la ligne Z. Enfin, le sarcomère se situe entre deux lignes Z successives.

II.3. Myogenèse d'une fibre musculaire chez l'adulte

La formation de la fibre musculaire nécessite une cascade de facteurs de transcription qui vont assurer la fusion des myoblastes en myotube. Pour cela, les **progéniteurs musculaires** donnent des **myoblastes** qui vont proliférer, migrer, se différencier en **myotubes** puis fusionner en **fibre musculaire**. Ces différentes étapes sont contrôlées par des facteurs de transcription permettant spécifiquement la formation du muscle : les facteurs myogéniques ou MRF (Myogenic Regulator Factor). Ces facteurs de transcription de base hélice-boucle-hélice (bHLH) comprennent Myf5, MyoD, Myogenine et Myf4 (Braun et al 1989, Davis et al 1987, Edmondson & Olson 1990, Rhodes & Konieczny 1989).

La SLA n'étant pas considérée comme une maladie développementale, il ne sera donc détaillé dans cette partie que la myogenèse adulte. Celle-ci fait appel à des **cellules satellites** qui sont des cellules souches embryonnaires provenant du somite étant définie comme des progéniteurs musculaires. Les cellules satellites vont rester dans des niches, entre l'endothélium et le sarcolemme, afin soit de former une réserve de cellules indifférenciées, soit de devenir des myoblastes en réponse à un stress (lésion musculaire, effort physique...).

Lorsque la **cellule satellite est inactivée**, il y a expression de **PAX3** et **PAX7**. Ces deux facteurs de transcription ont un rôle dans **l'activation des MRF**, puis il y a une répression progressive de PAX 3 et 7 pour laisser place à la myogenèse induite par les MRF (Kuang et al 2006, Relaix et al 2006, Seale et al 2000). Au repos, Pax7 assure le maintien et le renouvellement des cellules satellites en post natal. Il entraîne la prolifération des myoblastes et retarde la différenciation en modulant MyoD. En parallèle, myogenin, un acteur de la différenciation terminale, cible directement PAX7 et le diminue durant la différenciation (Olguin et al 2007, Zammit et al 2006). Plusieurs mécanismes sont à l'origine de **l'activation des cellules satellites** notamment la **sphingosine 1 phosphate** ou **l'oxyde nitrique**, qui induisent l'entrée dans le cycle cellulaire (Nagata et al 2006, Pisconti et al 2006, Wozniak & Anderson 2007). L'étude de Perdigueroe en 2007 a montré que la voie **p38 α / β MAPK** régule également la prolifération des cellules durant la myogenèse (Perdiguero et al 2007). L'absence de p38 α retarde la sortie du cycle cellulaire, les cellules sont donc incapables de se différencier.

Après l'activation, les cellules satellites sortent de la niche, se déplacent en dehors de l'endothélium et entrent dans le cycle cellulaire. Il y a alors expression de **Myf5** et **MyoD** entraînant la formation de myoblastes. En effet, Myf5 et MyoD permettent la **spécification** de la lignée. **Myf5 contrôle la prolifération et l'homéostasie** (Gayraud-Morel et al 2007, Ustanina et al 2007) tandis que **MyoD induit la différenciation des myoblastes en myotubes** (Cornelison et al 2000, Sabourin et al 1999).

Lors de la différenciation, il y a une diminution de l'expression de PAX3, PAX7 et Myf5 au profit de l'expression de MyoD. A cette étape, **Myogenin** est exprimée et cette expression entraîne **l'alignement** puis la **fusion** des myotubes en **myofibre multinucléée**. Enfin, **Myf4** est requis pour **l'hypertrophie** des fibres musculaires.

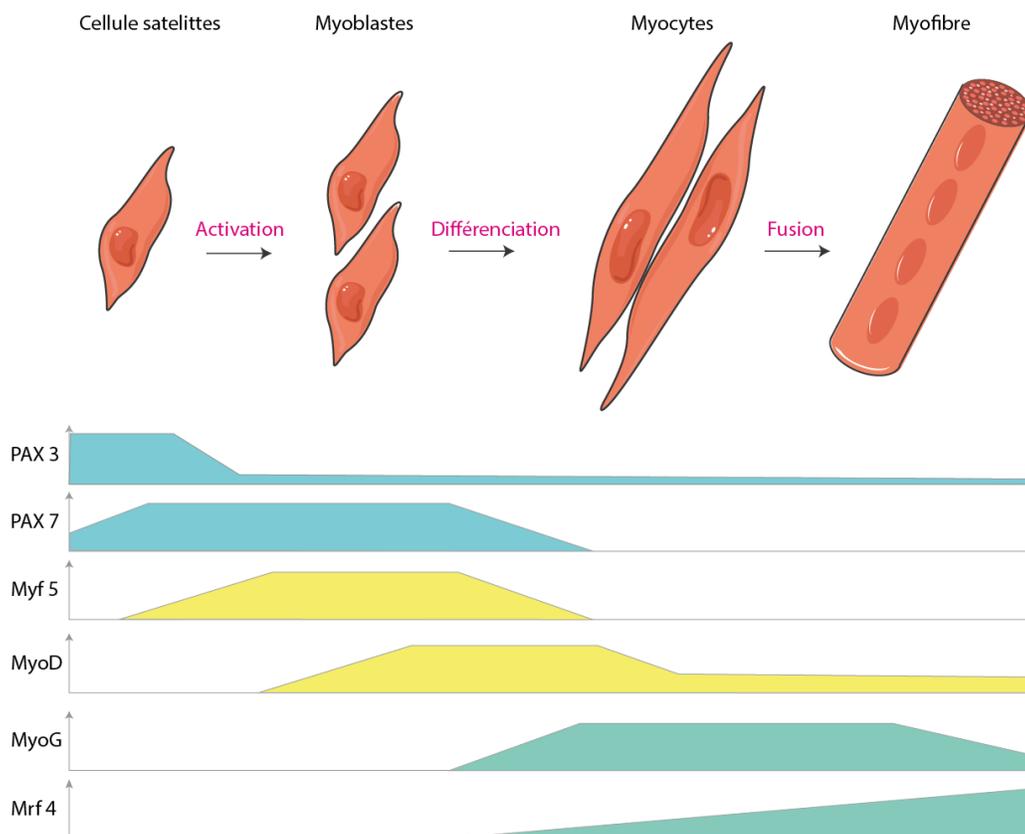


Figure 16 : Myogenèse chez l'adulte

Lors de la myogenèse, les cellules satellites s'activent et se différencient en myoblastes. Les myoblastes subissent ensuite une différenciation en myocyte puis fusionnent pour former des myotubes. Ces différentes étapes sont contrôlées des facteurs de transcriptions myogéniques qui interviennent successivement au cours de la myogenèse. Adaptation de (Bentzingert et al 2012, Le Grand & Rudnicki 2007).

II.4. Les Mef2

La découverte que les MRF sont capables d'entraîner l'expression de gènes qui ne contiennent pas leur domaine de liaison suggère la participation d'autres facteurs de transcription dans cet événement, dont les protéines de la famille **myocyte enhancer factor 2 (MEF2)**. Il a été montré que les MEF2 sont impliquées dans la myogenèse du muscle squelettique, plus particulièrement dans la **différenciation des myotubes** (Molkentin et al 1995).

Contrairement aux MRF, qui sont exprimées uniquement dans le **muscle squelettique**, la famille MEF2 est également exprimée dans les **muscles lisses, les muscles cardiaques, les neurones ou encore l'endothélium** (Potthoff & Olson 2007).

Chez les vertébrés, il existe 4 gènes dans la famille MEF2 : **Mef2 a, b, c et d**, là où les drosophiles et *C. elegans* n'en possèdent qu'un seul, le gène *Mef2* (Black & Olson 1998). Ces différents MEF2 appartiennent à la famille des facteurs de transcription MADS box.

En effet, parmi les 450 acides aminés des protéines MEF2, un **domaine MADS box**, est présent dans la partie N terminale de ces protéines, suivi d'un **domaine MEF2**. Ensemble, ces deux domaines permettent la dimérisation et la liaison à l'ADN. Les MEF2 forment alors un homo ou hétéro-dimère avec les ADN possédant la séquence **CTA (A/T)₄TAG**. Ils ont également la capacité de réaliser une recombinaison homologue à la présence d'une **jonction de Holliday** (HJURP-C) dans leur séquence. Enfin, dans la partie C terminale se trouvent deux **domaines d'activation transcriptionnelles** et une **séquence de localisation nucléaire** (Potthoff & Olson 2007).

Dans le muscle squelettique, cette famille est impliquée dans trois grandes fonctions : la différenciation des myotubes, la régénérescence musculaire et la typologie des fibres musculaires.

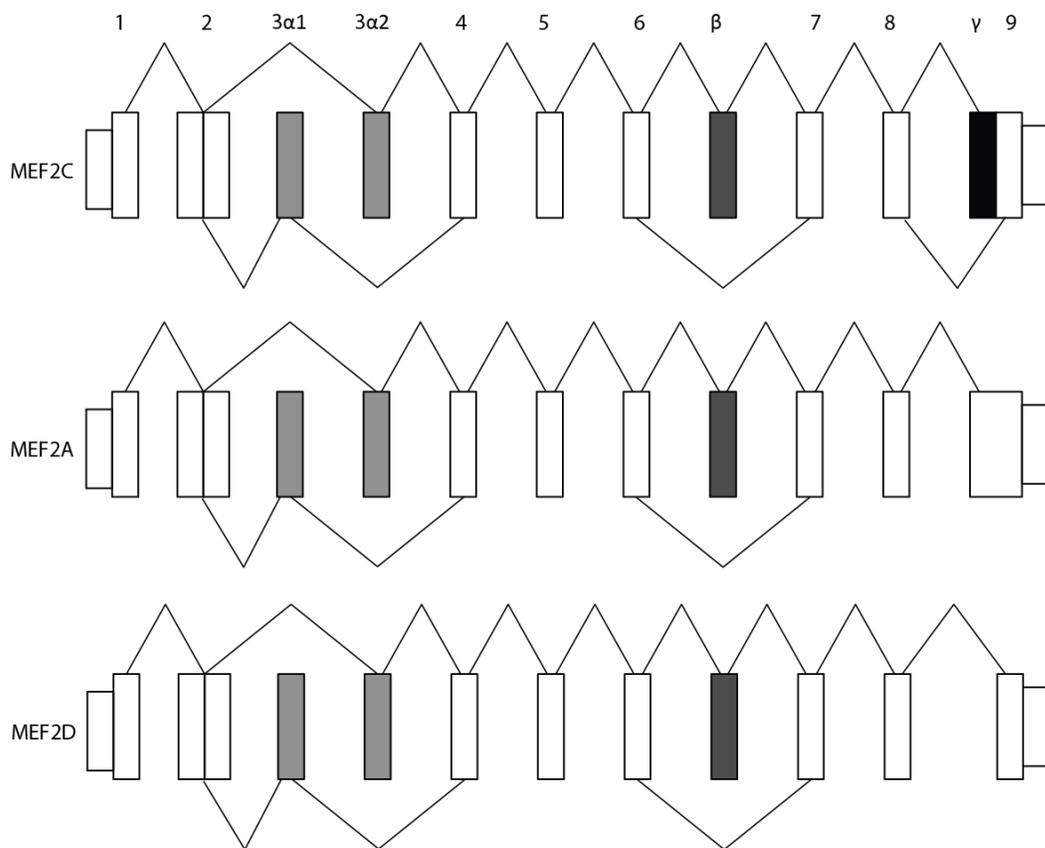


Figure 17 : Structure des MEF2

Les protéines MEF2 sont constituées d'un domaine MADS box, d'un domaine de MEF2 permettant la dimérisation et la liaison à l'ADN, d'une jonction de Holliday (HJURP-C), de deux domaines d'activation transcriptionnelle (TAD1 et 2) et d'une séquence de localisation nucléaire (NLS). La famille MEF2 est constituée de quatre membres : MEF2A, MEF2B, MEF2C et MEF2D. Des épissages alternatifs ont été identifiés dans trois membres de la famille.

Dans une culture de cellules de muscle, les C2C12, il a été montré que MEF2a est exprimé lors du premier jour de différenciation suivi de MEF2D le deuxième jour et enfin de MEF2C le troisième jour. La perte de fonction de la famille MEF2 empêche donc la formation de myotubes (Ornatsky et al 1997). De façon très intéressante, il a également été montré que le knock down de MEF2a altère la formation de myotubes (Snyder et al 2013). Les MEF2 sont donc nécessaires à la **différenciation des myotubes**. De plus, une synergie entre les MRF et MEF2 a été observée (Ornatsky et al 1997). En effet, MyoD induit l'expression des MEF2a, c et d permettant ainsi la liaison aux promoteurs myogéniques et entraînant l'interaction entre MEF2D et Pol II (Penn et al 2004). Une synergie est également présente entre Myogénine et Mef2c. Concernant la forme Mef2b, elle est très peu exprimée dans le muscle et son rôle est peu décrit. Les deux types de protéines pourront alors lier des ADN en utilisant des sites de liaisons séparés ou des sites de liaisons nécessitant l'interaction MRF/MEF2. Plus de 200 gènes impliqués dans la différenciation musculaire, la structure du muscle, l'adhésion, la fusion ou encore l'assemblage de la JNM sont régulés par les MEF2. En plus, de cette fonction au sein de la myogénèse, l'importance des MEF2 durant la **régénérescence musculaire** a été caractérisée. La perte de MEF2a entraîne un ralentissement de la régénérescence (Snyder et al 2013), et la perte combinée de MEF2a, c et d chez la souris bloquent la régénérescence musculaire (Liu et al 2014). MEF2a est également essentielle à l'activation des cellules satellites lors de la régénérescence musculaire (Liu et al 2014). Enfin, les MEF2 sont impliqués dans le **contrôle des types de fibres musculaires**. Elles vont moduler la taille, la croissance, la vitesse de contraction ou encore les propriétés métaboliques des fibres musculaires. En effet, le knock down de MEF2c chez la souris et le poisson zèbre ralentit la croissance et altère la contraction musculaire (Anderson et al 2015, Potthoff & Olson 2007, Yogev et al 2013). L'étude de Potthoff en 2007, a également montré que le knock down de MEF2c et MEF2d diminue le nombre de fibres lentes oxydatives. Ainsi, les Mef2 favorisent la formation de fibres lentes par une voie dépendante de la calcineurine (Wu et al 2001).

Les MEF2 jouent un rôle important dans la formation et le développement du muscle cependant des zones d'ombres restent à éclaircir quant au mécanisme impliquant MEF2 dans la différenciation musculaire.

III. Couplage neuromusculaire

Les fibres musculaires sont contactées par les NM afin de transmettre le signal nerveux en vue de provoquer la contraction musculaire. **Un NM contacte plusieurs fibres musculaires mais une fibre musculaire n'est contactée que par un NM.** Cette zone de contact au niveau du sarcolemme est une synapse cholinergique spécialisée, appelée la **jonction neuromusculaire** (JNM). Elle est constituée de 3 parties : les NM pré-synaptiques, le muscle squelettique post-synaptique et les cellules terminales de Schwann (Castonguay et al 2001).

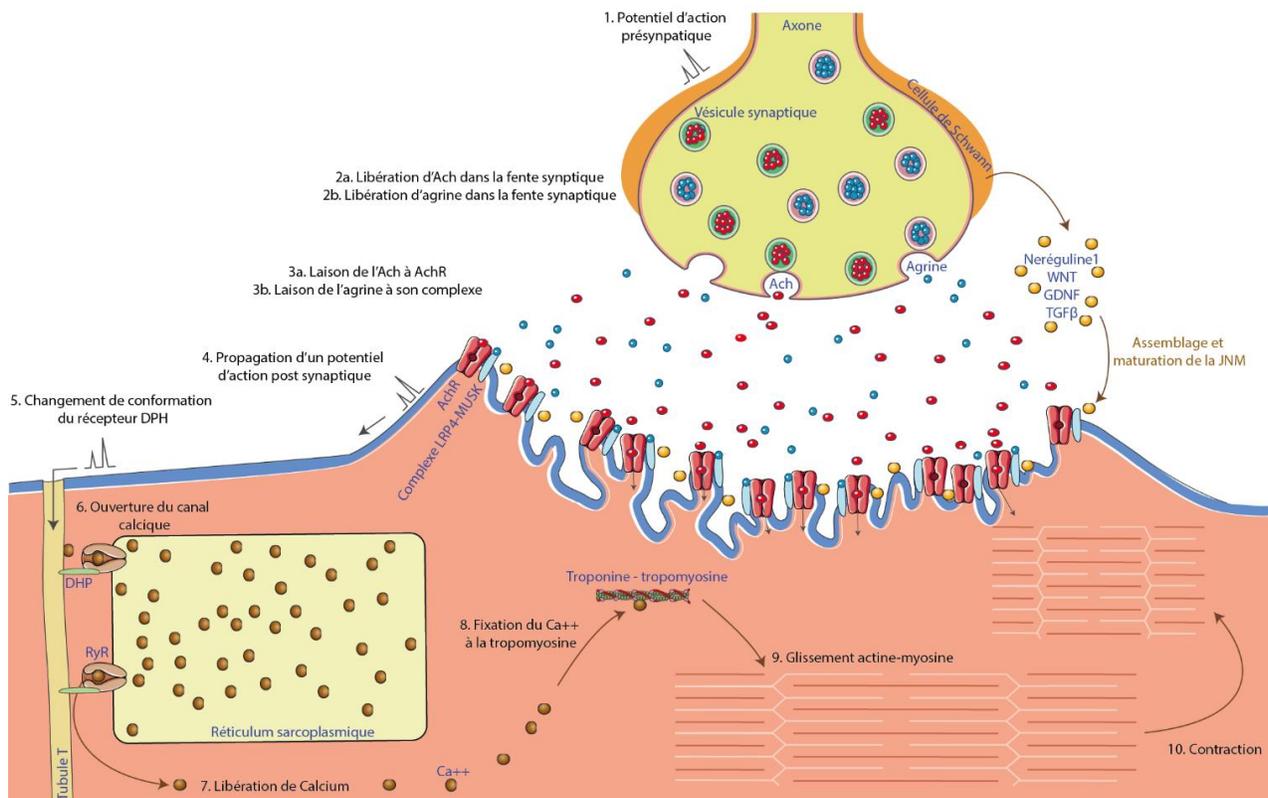


Figure 18 : Vue d'ensemble de la contraction musculaire

Un potentiel d'action, libéré dans la partie pré-synaptique, entraîne la libération d'acétylcholine (ACh) et d'agrine dans la fente synaptique. La liaison à leurs récepteurs libère un potentiel d'action post-synaptique entraînant un changement de conformation des récepteurs dihydropyridines (DPH) puis l'activation des récepteurs ryanodines (RyR) du réticulum sarcoplasmique. Le calcium, libéré par le réticulum sarcoplasmique, se fixe alors sur la tropomyosine et provoque la contraction par glissement de l'actine sur la myosine.

Les **cellules de Schwann** libèrent des facteurs régulant l'assemblage et la maturation de la JNM tels que l'agrine, les ligands WNT, la neuréguline 1 (NRG), Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), Transforming growth factor (TGF β) (Ko & Robitaille 2015).

Les **NM pré-synaptiques** quant à eux libèrent des neurotransmetteurs qui déclencheront le mécanisme de contraction en se liant sur leurs récepteurs post-synaptique dans le **muscle**.

Le principal neurotransmetteur au sein de la JNM est l'**acétylcholine** (Ach). Il est libéré par la partie pré-synaptique grâce à un influx calcique et des potentiels d'actions dans les NM qui conduisent à la **fusion des vésicules synaptiques**. Cette fusion permet alors la libération d'Ach, dans la fente synaptique, qui va se lier dans la partie post-synaptique à ses **récepteurs nicotiniques (AchR) couplés à des canaux sodiques** (Flucher & Daniels 1989). Les récepteurs seront alors perméables aux ions sodium, potassium et dans une moindre mesure aux ions calcium. Un courant de 4 nano Ampère (nA) est libéré dans la fibre musculaire grâce à la fusion d'une vésicule. Lorsque plusieurs vésicules fusionnent et engendrent un courant de plus de 100 nA, elles induisent une **dépolarisation locale** (30-40 mV) de la fibre musculaire. Le potentiel post-synaptique créé se propage au sein de la fibre musculaire, grâce aux **tubules T**, jusqu'au **réticulum sarcoplasmique**. Les **récepteurs dihydropyridines (DPH)** présents au niveau du sarcolemme du réticulum sarcoplasmique, changent alors de conformation ce qui active les **récepteurs ryanodines** aboutissant à la libération de **calcium** dans le sarcoplasme. Le calcium se fixe ensuite sur la **troponine** et entraîne la **contraction via le glissement actine-myosine**.

Une autre protéine impliquée dans la JNM, l'**agrine**, est libérée par les NM dans la fente synaptique. L'agrine se fixe à son récepteur **LRP4** (low-density lipoprotein receptor-related protein 4) qui active **MUSK** (muscle-specific tyrosine kinase receptor). Pour cela, **dok7**, un adaptateur protéique musculaire, entraîne la phosphorylation de MUSK (Okada et al 2006). Celle-ci permettra ensuite le recrutement de **rapsyne** qui se lie d'une part aux AchR et d'autre part aux **dystroglycanes** (Lee et al 2009). S'en suit un regroupement des AchR qui seront assemblés par le **complexe dystrophine-glycoprotéine** (contenant les dystroglycanes) à la lame basale (Bartoli et al 2001, Sanes & Lichtman 2001). Ce regroupement des AchR est nécessaire pour induire la dépolarisation.

D'autres protéines sont également requises pour la formation de la JNM. La **NRG** se lie à ses récepteurs ErbB2/3/4 (Meier et al 1998) pour maintenir la JNM. En effet, une déplétion d'ErbB2 dans le muscle squelettique destabilise les AchR (Schmidt et al 2011). Le maintien et la formation de la JNM sont également dus à la **famille Wnt** qui sécrète des glycoprotéines capables de se lier à MUSK. Wnt induit la phosphorylation de Musk en absence d'agrine ou améliore le regroupement des AchR en présence d'agrine (Barik et al 2014, Henriquez et al 2008, Strohlic et al 2012, Zhang et al 2012).

La fin de la transmission synaptique se produit grâce à l'intervention de **l'acétylcholine estérase** qui hydrolyse l'Ach de la fente synaptique (Taylor & Radic 1994). Les membranes retrouvent leur potentiel de repos et le calcium n'est plus fixé à la toponine, il est recapturé par les récepteurs sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) et le muscle se relaxe.

En conclusion, afin d'assurer la contraction musculaire, plusieurs paramètres sont nécessaires au bon fonctionnement de la JNM : la taille du NM (déterminant le nombre de zones où les vésicules synaptiques fusionneront), la concentration en Ach dans les vésicules, le nombre et la densité des AchR ainsi que l'activité de l'acétylcholine estérase (Wood & Slater 2001).

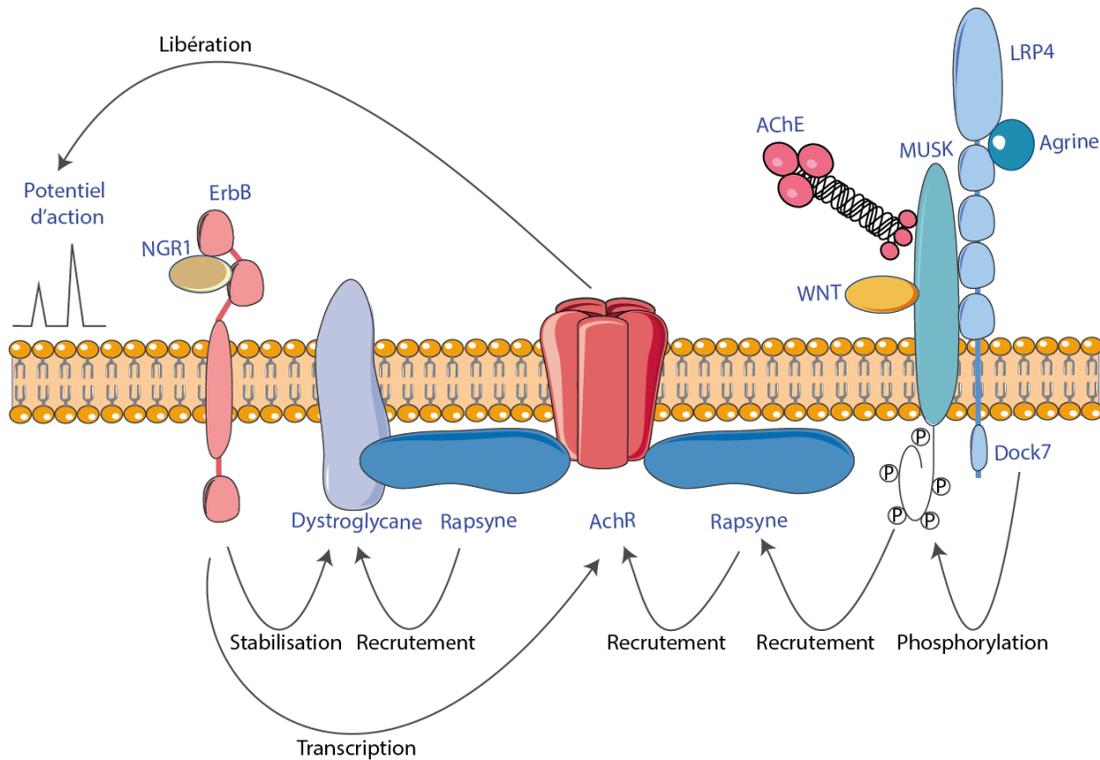


Figure 19 : Molécules impliquées dans la formation de la partie post-synaptique de la jonction neuromusculaire.

Dans la partie post synaptique de la jonction neuromusculaire, l'acétylcholine se lie à son récepteur nicotinique (AchR) et le récepteur LRP4/MUSK/Dock7 est activé par l'agrine ou un membre de la famille Wnt. L'activation de LRP4/MUSK/Dock7 entraîne alors le recrutement de la rapsyne qui se lie aux AchR et aux dystroglycanes permettant ainsi l'assemblage à la lame basale. Par la suite, la liaison de la neuréguline à son récepteur ErbB stabilisera ce complexe et permettra la transcription des AchR. Enfin, la transmission synaptique se terminera suite à l'hydrolyse de l'Ach par l'acétylcholinestérase (AChE).

IV. Transcription des AchR

Au sein de la JNM, la **transcription des gènes synaptiques peut se produire de façon dépendante et indépendante du nerf**. En effet, l'étude de Lin et collaborateurs en 2001 montre que la formation de la JNM est indépendante de l'agrine mais dépendante de MUSK et Rapsyne. Le regroupement des AchR serait initié par une voie MUSK/Rapsyne dépendante - agrine indépendante. Cependant, l'innervation et la présence d'agrine entraînent une synthèse plus importante des AchR et sont nécessaires à la stabilisation et au regroupement des AchR.

En effet, avant l'innervation, les AchR sont répartis de façon uniforme dans la partie post synaptique ($100 \text{ AchR}/\mu\text{m}^2$ tout le long du muscle) alors qu'après innervation les AchR sont attirés au niveau de la JNM. Il y a ainsi une **hyper concentration en AchR sous la JNM** ($10\,000 \text{ AchR}/\mu\text{m}^2$) **et un appauvrissement à l'extérieur de cette zone** ($10 \text{ AchR}/\mu\text{m}^2$). Ceci est expliqué par deux mécanismes. Premièrement, les neurones libèrent des neurotransmetteurs impliqués dans le regroupement des AchR au niveau de la JNM tel que l'agrine. Deuxièmement, la transcription est activée dans les noyaux sous-synaptiques et est réprimée dans les noyaux extra-synaptiques (Sanes & Lichtman 1999).

IV.1. Transcription dans les noyaux sous-synaptiques

Dans les **noyaux sous-synaptiques**, l'étude de Meier et collaborateurs en 1998 a montré que la neuréguline (NRG) entraîne la transcription des AchR, au niveau de la JNM, en agissant comme un second messenger de **MUSK** et **agrine**. Dans un modèle de souris hétérozygotes NRG, une diminution de 50% des AchR est observée, ce qui confirme le rôle de la NRG dans la transcription de ces récepteurs (Sandrock et al 1997). La **NRG** joue donc un rôle important au sein de la JNM grâce à son action dans la transcription des noyaux sous-synaptiques mais aussi grâce à son effet potentialisateur du regroupement des AchR induit par l'agrine (Ngo et al 2012). Suite à la fixation de l'agrine sur son récepteur LRP4/MUSK, la NRG se lie à ses récepteurs **ErbB2** et **ErbB4** pour entraîner la transcription des sous unités α , δ , ϵ des AchR et des gènes codant pour des protéines synaptiques tel que la rapsyne (Jones et al 1999, Meier et al 1998, Sanes & Lichtman 1999). En effet, l'activation par phosphorylation des récepteurs ErbB2 et 4 active ensuite la voie de signalisation **SH2/Ras/PI3K**. Puis l'activation de Ras déclenche deux

voies de signalisation : la voie **Raf/Erk/c-Fos** et **MKK4/JNK/c-Jun** qui phosphorylent des gènes possédants une N box (appelé aussi site de liaison ETS) (Altiok et al 1997, Si et al 1999). La **N box** est indispensable à l'expression synaptique de AchR δ et AchR ϵ (Duclert et al 1996, Koike et al 1995), il a aussi été montré qu'une mutation dans la N box du promoteur de AchR δ abolie sa transcription (Fromm & Burden 1998). Par ailleurs, l'étude de Schaeffer et collaborateurs en 1998 a montré, dans une culture de myotubes, que NRG entraîne la phosphorylation de **GABP** α et β qui se lie alors à la N box pour induire la **transcription des AchR** δ et ϵ . Pour cela, GABP recrute l'histone déacétylase p300 (HAT p300) sur le promoteur AchR ϵ (Ravel-Chapuis et al 2007).

Une synergie entre NRG et p35/cdk5 est également présente afin d'augmenter l'expression des AchR via l'activation de Ras (Fu et al 2001). Par ailleurs, GABP peut également interagir avec Sp1 et Sp3 pour activer la transcription de l'utrophine, une protéine du cytosquelette semblable à la dystrophine (Galvagni et al 2001).

En parallèle de cette voie, Lacazette et collaborateurs ont montré, en 2003, que la liaison de l'**agrine** à **LRP4/MUSK** déclenche également l'activation de **Rac/cd42**, **MKK7** puis de **JNK** entraînant ainsi la transcription de MUSK, ErbB et AchR (Lacazette et al 2003). Le rôle central de MUSK dans la transcription sous-synaptique a été confirmé par Strochlic et collaborateurs montrant que la protéine **14-3-3 γ** , faisant partie de MUSK, réprime la transcription des gènes sous-synaptiques *in vitro* et *in vivo* (Strochlic et al 2004).

Enfin, en 2007, l'étude de Hippenmeyer et collaborateurs identifie un nouvel acteur dans la transcription sous-synaptique des AchR : **ERM** (Hippenmeyer et al 2007). Le knock out d'ERM, qui est exprimé dans les noyaux sous-synaptiques, entraîne une faiblesse musculaire, une fragmentation de la JNM, une diminution de la taille du regroupement de AchR ainsi qu'une diminution de l'expression de gènes sous-synaptiques (AchR ϵ , AchR δ , MUSK).

IV.2. Transcription dans les noyaux extra-synaptiques

De façon simultanée à la transcription synaptique, une **répression de la transcription extra-synaptique** est déclenchée. La **dépolarisation** musculaire induite par la liaison de l'Ach à son récepteur entraîne un influx calcique qui stimule la **cyclin-dependent kinase 5 (cdk5)**, la **protéine kinase C (PKC)** et la **calcium /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII)**. Cela active alors **JNK** qui phosphoryle **myogénine** (Fu et al 2005, Lin et al 2005, Macpherson et al 2002, Mendelzon et al 1994). En effet, l'étude de Gundersen et collaborateurs en 1995 a montré que la surexpression de myogénine induit une augmentation de l'ARNm et des protéines des AchR dans la partie extra-synaptique (Gundersen et al 1995). De plus, Eftimie et collaborateurs en 1991 ont montré que Myogénine se lie à la **E box** pour réguler la transcription des AchR en absence d'activité électrique (Eftimie et al 1991).

Cette diminution peut également provenir d'une **répression des myogénines**. Plusieurs répresseurs ont été identifiés notamment MITR, DACH2 et MSY3. En effet, l'étude de Mejat et collaborateurs en 2005 a montré que **MITR**, un variant d'épissage de l'histone déacétylase 9 (HDAC9), est un répresseur de myogénine et de MEF2 (Mejat et al 2005). L'étude de Tang et collaborateurs en 2009, quant à elle, montre qu'en présence de dénervation, la diminution de l'influx calcique active l'histone déacétylase 4 (HDAC4) ce qui induit l'inhibition de **DACH2/MITR** (Tang et al 2009). Cette inhibition active myogénine entraînant ainsi la transcription des AchR. Enfin, **MYS3** a été identifié comme étant un répresseur de la transcription extra-synaptique médié par myogénine (Berghella et al 2008).

De façon très intéressante, l'étude de Ravel-Chapuis et collaborateurs en 2007, a montré que dans les noyaux extra-synaptiques, GABP recrute **HDAC1** au lieu de HAT p300 sur le promoteur des gènes synaptiques bloquant ainsi la transcription (Ravel-Chapuis et al 2007).

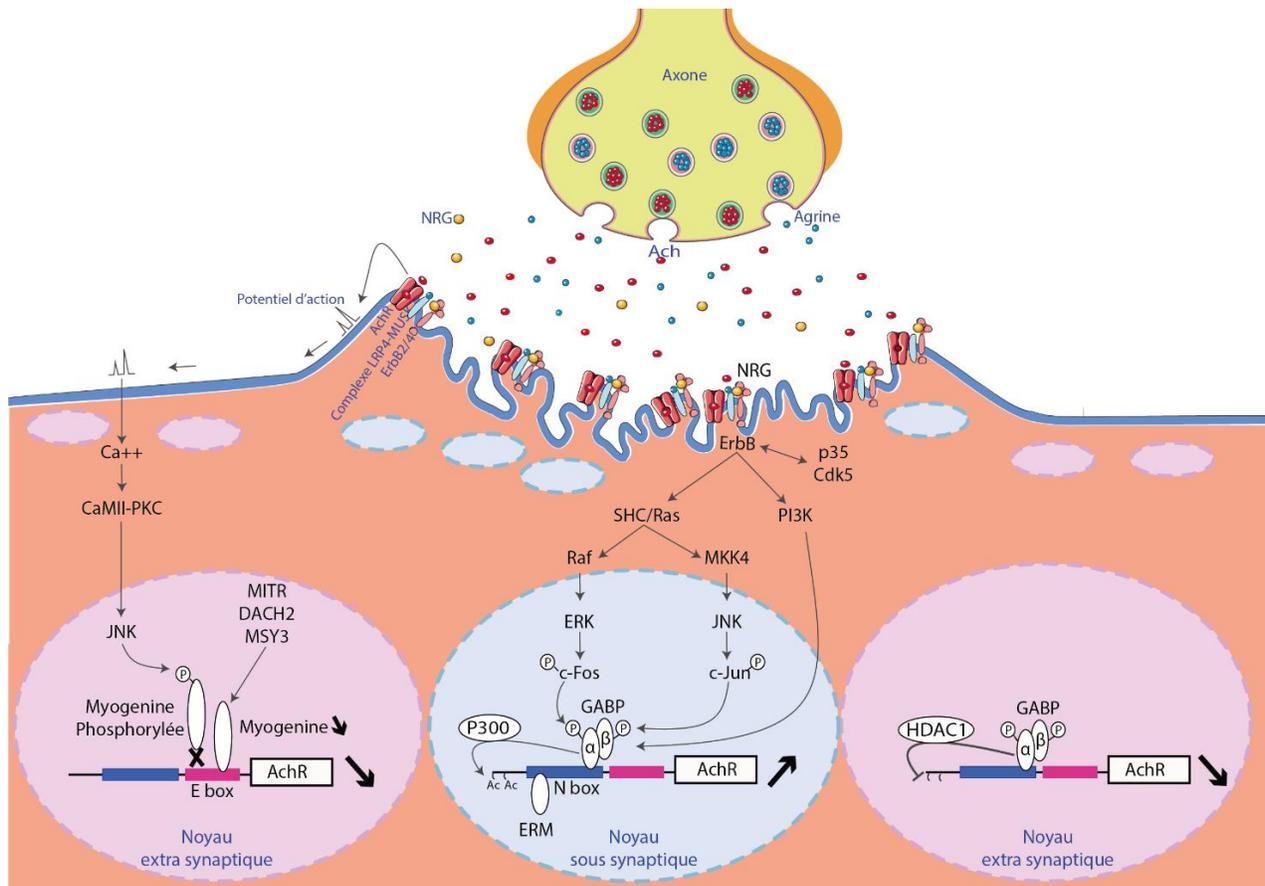


Figure 20 : Transcription des AchR

La transcription des AchR est régulée par des mécanismes au sein des noyaux sous-synaptiques et extra-synaptiques. Suite à la fixation de l'agrine sur son récepteur, la neuréguline 1 (NRG) se lie à son récepteur ErbB et active la voie de signalisation SHC/Ras/PI3K. Par la suite, plusieurs kinases s'activent et phosphorylent des gènes possédant un site de liaison ETS (N box). Ceci entraîne la transcription des AchR. D'autre part, ERM, un facteur ETS, est capable à lui seul d'induire la transcription des AchR. Dans les noyaux extra-synaptiques, la dépolarisation musculaire active cdk5 et la calcium-calmoduline dépendante de la kinase II (CaMKII) qui phosphorylent la myogénine. Elle ne peut alors plus se lier à la E box ce qui diminue la transcription des AchR. Une autre façon de diminuer la transcription synaptique consiste à diminuer la quantité de myogénine grâce aux répresseurs MITR, DACH2 et MSY3. Enfin dans les noyaux extra-synaptiques, HDAC1 est recruté par GABP, au lieu de HAT P300. La transcription est alors inhibée par la désacétylation induite par HDAC1

V. Rôle du muscle dans la SLA

Précédemment, il a été montré que plusieurs types cellulaires sont impliqués dans la physiopathologie de la SLA. Chez les patients tout comme chez les souris SOD1, la jonction neuromusculaire est la première structure à être affectée par la maladie (Fischer et al 2004, Gonzalez de Aguilar et al 2008, Jokic et al 2006). En effet, la rétraction du nerf terminal et la perte des synapses neuromusculaires sont les premiers événements de la SLA, apparaissant avant la dégénérescence des NM (Frey et al 2000, Pun et al 2006). Le démantèlement de la JNM pourrait, au moins en partie, être causé par des événements intrinsèques au muscle.

De façon générale, il a été montré que l'expression sélective de SOD1^{G93A} dans le muscle est suffisante pour déclencher l'atrophie musculaire, le stress oxydatif, la mort des neurones moteurs et l'activation gliale (Dobrowolny et al 2008, Wong & Martin 2010). En outre, l'ablation de l'inhibiteur Nogo-A, neurite out growth inhibitor, dans le muscle de souris SOD1 augmente la survie, empêche l'atrophie et la dénervation (Jokic et al 2006) et améliore les fonctions musculaires dans la SLA (Perez-Garcia & Burden 2012). D'autres études ont montré que l'hypermétabolisme musculaire est suffisant pour affecter la stabilité et la fonction de NMJ (Dupuis et al 2009) et contribuer à la dégénérescence des motoneurones (Dupuis et al 2011, Palamiuc et al 2015).

Plus récemment, Cykowski et collaborateurs en 2018 ont étudié la prévalence et la distribution de TDP-43 phosphorylé (pTDP-43) dans 148 muscles de 57 patients SLA (Cykowski et al 2018). Ils ont montré que des inclusions de pTDP-43 sont présentes dans les fibres musculaires de 19 patients SLA et dans 48 muscles dont les muscles paraspinaux, le diaphragme, le deltoïde et le muscle gastrocnémien. Ils se sont également intéressés à l'autophagie induite par p62 et sequestrosomes-1 et ont montré que les agrégats pTDP-43 sont p62 et sequestrosome-1 positifs. La présence de pTDP-43 dans le muscle squelettique des patients SLA avec des formes sporadiques ou familiales suggère que le muscle squelettique est un nouveau site pathologique dans les SLA liées à TDP-43.

Dans la même lignée, la pathologie musculaire a été caractérisée suite à 3 injections de liquide céphalorachidien (LCR) de patients SLA sporadiques dans l'espace sous arachnoïdien de rat âgés de 3, 9 et 14 jours (Shanmukha et al 2018). Cette étude a révélé une atrophie des fibres de type

2 des muscles longs extenseurs (EDL) associée à la perte de l'intégrité membranaire du muscle chez les rats à P16 (16 jours post-natal). La morphologie du muscle est également altérée et un immunomarquage a révélé une fragmentation de la JNM et une dénervation du muscle. Ceci peut être expliqué par une diminution de l'expression de la rapsyne (qui augmente le regroupement des récepteurs de l'acétylcholine) et par une augmentation de l'expression de la calpaïne (qui entraîne la dispersion des AchR et la fragmentation de la JNM). Au sein du muscle, une altération de la morphologie des mitochondries ainsi qu'un stress oxydatif ont été identifiés. Enfin, une altération des facteurs neurotrophiques tels que VEGF, BDNF et GDNF est observée. L'injection de LCR de patients SLA engendre un désordre musculaire qui pourrait aggraver la pathologie neuronale.

A travers ces diverses études, le muscle et la jonction neuromusculaire apparaissent comme des moteurs principaux dans les phénotypes SLA, cependant il n'existe actuellement aucune information sur un rôle potentiel de FUS dans muscle ou la NMJ. La contribution potentielle du muscle à la maladie est donc un aspect clé de mon travail de thèse. Pour le présenter de façon synthétique, nous avons rédigé une revue dont je suis co-premier auteur, et qui est présentée dans les pages suivantes.

MINI-SYMPOSIUM: AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: AN UPDATE ON ITS COMPLEXITY

The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral SclerosisJean-Philippe Loeffler^{1,2*}; Gina Picchiarelli^{1,2*}; Luc Dupuis^{1,2}; Jose-Luis Gonzalez De Aguilar^{1,2}¹ Université de Strasbourg, UMR_S 1118, Strasbourg, France.² INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, Strasbourg, France.**Keywords**

amyotrophic lateral sclerosis, Cu/Zn-superoxide dismutase, energy metabolism, mitochondria, oxidative stress, skeletal muscle.

Corresponding author:

Jose-Luis Gonzalez De Aguilar, Université de Strasbourg, INSERM U1118, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, F-67085 Strasbourg, France (E-mail: gonzalez@unistra.fr)

Received 11 January 2016

Accepted 14 January 2016

*These authors contributed equally to this work.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

doi:10.1111/bpa.12350

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating condition primarily characterized by the selective loss of upper motor neurons in the motor cortex and lower motor neurons in the brainstem and the spinal cord. Clinical hallmarks include progressive muscle wasting, speech and swallowing difficulties, fasciculations, altered reflexes, and spasticity. Death usually occurs by respiratory complications within 2–5 years of diagnosis. The disease typically appears between 40 and 70 years of age, and affects about two in 100 000 people. Around 90% of cases are sporadic. The remaining 10% exhibit a Mendelian pattern of inheritance, mainly in an autosomal dominant manner. Both forms are clinically and pathologically undistinguishable, so that it is assumed that they share common pathogenic mechanisms. Riluzole, which provides neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity, is the only accepted medication for the treatment of ALS, although its benefit is limited (56).

Defects in a heterogeneous group of genes have been implicated in the pathogenesis of ALS (listed at <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>). Mutations in *SOD1*, which encodes the free radical-scavenging enzyme Cu/Zn superoxide dismutase, account for 20% of familial cases and 2%–7% of sporadic cases (96, 100). Transgenic mice with mutations in *sod1* have precipitous, age-related loss of motor

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal adult-onset disease primarily characterized by upper and lower motor neuron degeneration, muscle wasting and paralysis. It is increasingly accepted that the pathological process leading to ALS is the result of multiple disease mechanisms that operate within motor neurons and other cell types both inside and outside the central nervous system. The implication of skeletal muscle has been the subject of a number of studies conducted on patients and related animal models. In this review, we describe the features of ALS muscle pathology and discuss on the contribution of muscle to the pathological process. We also give an overview of the therapeutic strategies proposed to alleviate muscle pathology or to deliver curative agents to motor neurons. ALS muscle mainly suffers from oxidative stress, mitochondrial dysfunction and bioenergetic disturbances. However, the way by which the disease affects different types of myofibers depends on their contractile and metabolic features. Although the implication of muscle in nourishing the degenerative process is still debated, there is compelling evidence suggesting that it may play a critical role. Detailed understanding of the muscle pathology in ALS could, therefore, lead to the identification of new therapeutic targets.

neurons, and are a well-characterized animal model of human ALS (44, 98, 130). Most of the investigations presented in this article have been conducted on transgenic mouse lines overexpressing mutant forms of *SOD1*. Other major genes whose mutations cause ALS are *C9orf72* (40% of familial cases and 5–7% of sporadic cases), *FUS* (5% of familial cases and less than 1% of sporadic cases) and *TARDBP* (3% of familial cases and 1.5% of sporadic cases) (27, 64, 108).

Multiple pathogenic mechanisms have been proposed to contribute to motor neuron degeneration, including excitotoxicity, oxidative stress, aberrant protein aggregation, defective axonal transport, mitochondrial dysfunction and altered RNA metabolism (4, 6, 7, 19, 40, 68). However, the precise nature of the selective loss of motor neurons still remains obscure. The situation is even more complex than imagined, since growing evidence supports that ALS not only affects motor neurons but also other cells. In the spinal cord, astrocytes and microglial cells, as well as oligodendrocytes and interneurons, which have been more recently implicated, appear to contribute to the degenerative process (84, 93, 95, 120). Other neurons are also affected, such as serotonergic neurons in the brainstem and neurons in the frontal and temporal lobes (28, 118). Beyond the central nervous system, it is also commonly accepted that the dismantlement of

neuromuscular junctions is one of the earliest events occurring prior to motor neuron degeneration (81). In this context, it has been postulated that skeletal myocytes could play an active role, instead of merely suffering from motor neuronal loss. Here, we describe the features of ALS muscle pathology and discuss on the contribution of muscle to the pathological process. We also give an overview of the therapeutic strategies proposed to alleviate muscle pathology or to deliver curative agents to motor neurons.

OXIDATIVE STRESS AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION CHARACTERIZE ALS MUSCLE PATHOLOGY

Early studies conducted on mutant SOD1 mice showed a progressive age-dependent aggregation of mutant enzyme in hindlimb muscle (116), leading to the belief that similar pathogenic events might affect motor neurons and myofibers. In addition, heat shock proteins were present in muscle at lower levels than in spinal cord (5, 126), suggesting that myofibers would be intrinsically susceptible to accumulation of malformed proteins. In parallel, increased amounts of reactive oxygen species were found in mutant SOD1 muscle even before motor impairment (46). As a result, superoxide dismutase and catalase activities were shown to increase in an attempt to counterbalance the disturbances in the normal redox state of myofibers (65, 72). The stimulation of these antioxidant defences, therefore, points to the presence of oxidative stress. Interestingly, this would account for the enhanced vulnerability of mutant SOD1 muscle to paraquat, which is an herbicide that generates high amounts of highly toxic radicals (92).

On the basis of proteomics studies, it was postulated that the accumulation of reactive oxygen species in mutant SOD1 muscle might be at least in part the result of an exacerbated oxidative metabolism (12). The increased expression of several genes involved in lipoprotein clearance and fatty acid transport, even during the presymptomatic stage (35, 39), would be related to such a boosted metabolism. Interestingly, high fat diets provided beneficial effects to mutant SOD1 mice, suggesting that a “hypermetabolic” condition could help to fight against the disease (35). This viewpoint is supported by recent studies that investigated the consequences of the genetic ablation of AMPK, an enzyme that typically stimulates the consumption of fatty acids in skeletal muscle via the β -oxidation pathway. AMPK knockout mice exhibited gait disturbances reminiscent of that observed in the mutant SOD1 model (121). However, it should be taken into account that an enhanced oxidative metabolism, together with an excess of reactive oxygen species, would eventually lead to dysfunction of the respiratory electron transport chain, which would generate in itself more oxidative stresses. The altered expression of PGC-1 α , a transcription coactivator that normally stimulates mitochondrial biogenesis (101, 113), would contribute to this vicious circle. In fact, increasing PGC-1 α content in mutant SOD1 muscle by genetic means maintained mitochondrial biogenesis and improved muscle function even at end-stage disease (23), further reinforcing the relevance of mitochondrial dysfunction to ALS muscle.

Metabolic perturbations were also observed in other animal models of ALS, such as mice knockout for TDP-43 and VAPB (47, 109). In addition, several studies conducted on muscle biopsies

obtained from patients pointed to mitochondrial dysfunction, as revealed by biochemical abnormalities (22, 106, 107, 123, 127), alterations of mitochondrial DNA (2, 122) and, in some cases, ultrastructural modifications (16). Contrasting with these observations, other studies showed that mitochondrial damage was only mild (1, 37, 62, 102) but increased with disease progression (36). Taken together, these findings support the notion that oxidative stress and bioenergetic alterations are essential features of ALS muscle pathology.

MOTOR NEURONS OR MYOFIBERS: WHO ARE FIRST?

Some studies mentioned above suggested that skeletal muscle can be precociously affected in ALS in a manner that is independent on the denervation process propelled by degenerating motor neurons. Several lines of research support this hypothesis. First reports provided evidence for the activation of an antioxidant response during the presymptomatic stage in muscle of two transgenic mouse lines expressing mutant SOD1 (60). Based on magnetic resonance imaging, other investigations revealed that muscle volume of mutant SOD1 mice was reduced from as early as 8 weeks of age, long before disease (75). By injecting oocytes with muscle membranes derived from ALS patients, it was shown that the affinity of acetylcholine receptors for their ligand was lower than that of receptors coming from surgically denervated muscle (88). Additional studies reported electrophysiological postsynaptic alterations in diaphragm at 4–6 weeks of age (99), indicating that neuromuscular transmission could be intrinsically affected. Several other changes at the molecular level occurred presymptomatically, that is, between 27 and 40 days of age, including a decrease in the activity of CDK5, which has been involved in myogenesis (90), and an abnormal cytoplasmic accumulation of nNOS, which has been shown to stimulate mitochondrial oxidative phosphorylation (112). Finally, the expression of different panels of genes involved in muscle growth and development was reported to be up-regulated in gastrocnemius of presymptomatic mutant SOD1 mice (25, 41).

In view of these findings, several studies aimed at answering to the question of whether skeletal muscle plays a critical role in ALS neurodegeneration. It was first reported that mutant SOD1 overexpression in muscle could be partially reduced by genetic means without affecting disease progression or survival. In addition, AAV-based delivery of follistatin to muscles of mutant SOD1 mice stimulated, as expected, their growth but had no effect on survival (79). Using a complementary experimental approach, it was shown that the muscle specific expression of mutant SOD1 was able to reduce muscle strength, induce atrophy and cause mitochondrial dysfunction, but it was not sufficient to trigger motor neuron degeneration consistent with ALS (32). These initial findings led to the conclusion that skeletal muscle do not seem to be a primary source of toxicity for killing motor neurons. Contrasting with these results, follow-up studies revealed that muscle overexpression of mutant SOD1 did reproduce ALS hallmarks, including muscle weakness, abnormal neuromuscular junctions, axonopathy and motor neuron degeneration (129). These findings provided evidence for a muscle-to-motor neuron dying-back process which, in fact, is not without

precedent. For instance, muscle specific overexpression of the axon regeneration inhibitor Nogo-A triggered shrinkage of the postsynaptic apparatus and retraction of the presynaptic motor ending (54). In as much as Nogo-A up-regulation was observed in atrophic myofibers of ALS patients at levels that correlated with the severity of the clinical symptoms (55), its expression could be related to neuromuscular junction dismantlement (10). Additional studies reported that transgenic mice overexpressing UCPI, as a means to generate muscle restricted mitochondrial uncoupling, suffered from a progressive deterioration of neuromuscular junctions associated with signs of denervation and mild late-onset motor neuron pathology (34). Although not treated in this review, it is noteworthy to mention that skeletal muscle has been shown to contribute to motor neuron degeneration in another motor neuron disease such as spinal and bulbar muscular atrophy (18). In all, these findings provide the proof of concept that specific muscle defects can destabilize motor nerve terminals and hence contribute to ALS.

Last but not least, a few studies focused on the effects of ALS on satellite cells, which are skeletal muscle stem cells that can convert into mature myofibers in response to regenerative stimuli. It was shown that the expression of the satellite cell marker Pax7 was up-regulated in presymptomatic but not end-stage mutant SOD1 mice (74). Most importantly, satellite cells isolated from presymptomatic animals exhibited less proliferative capacity *in vitro* than satellite cells isolated from wild-type littermates (73). This diminished capacity to develop normally was also observed in satellite cells derived from ALS patients (94, 103). As these cells neither contract nor receive direct motor neuronal input, it is speculated that their modifications could attest at least in part to an intrinsic muscle pathology.

DOES MUTANT SOD1 TOXICITY AFFECT ALL MUSCLES INDISTINCTLY?

Skeletal muscle is a heterogeneous tissue composed of several kinds of myofibers with distinctive ultrastructural, contractile and metabolic features. The orchestrated action of different types of myofibers enables muscles to adapt to changing functional requirements. Whether or not these myofibers, or whole muscles, are affected by ALS in the same manner has been the subject of a number of (conflicting) studies. First experiments performed on mutant SOD1 mice showed decreased maximal oxygen consumption in mitochondria of oxidative slow-twitch soleus, compared to that observed in glycolytic fast-twitch extensor digitorum longus (EDL), suggesting that the disease would affect in particular muscles displaying oxidative metabolism (65). Mass spectrometry studies of the wobbler mouse model of motor neuron disease revealed an increase in the amount of the glycolytic enzyme G3PDH, hence suggesting a shift from oxidative to glycolytic metabolism during the course of the disease (110). Contrasting studies established, however, that, despite a similar charge in mutant SOD1, fast-twitch fibers isolated from transgenic mice developed less force than slow-twitch fibers in response to calcium stimulation, when compared to control fibers isolated from wild-type littermates (3). Using mutant SOD1 mice expressing neuronal YFP, additional studies demonstrated that motor terminals from EDL and plantaris were more affected by ischaemia/reperfusion

stress than motor terminals from soleus. Most importantly, this phenomenon was observed presymptomatically from as early as 31 days of age (24). Similarly, quantification of isometric forces in several fast-twitch muscles of mutant SOD1 mice revealed a decrease in the number of motor units from 40 days of age, whereas this number was found to decline in slow-twitch soleus only after the onset of symptoms (48, 49).

The reasons for the differential vulnerability between myofibers are still obscure. The axon repellent semaphorin 3A was shown to be expressed by terminal Schwann cells only in fast-fatigable neuromuscular junctions of mutant SOD1 mice, thus suggesting a mechanism by which these synapses would exhibit less plasticity in response to ALS and hence would be affected earlier (26). It was also reported that the disease in mutant SOD1 mice progressed faster in the absence of microRNA-206, which has been involved in the regeneration of neuromuscular junctions in response to injury (117, 128). The expression of microRNA-206 was selectively up-regulated in fast-twitch muscle, likely as a compensatory mechanism to halt disease progression in this muscle (114). Notably, it has been observed that fast-twitch motor units become hyperactive in response to mild denervation. Thus, the exposure of mutant SOD1 mice to this challenge was able to prevent the reduction in the number of fast-twitch motor units in presymptomatic animals (43). Similarly, the recovery of muscle function after sciatic nerve crush was accelerated by repressing the expression of SCD1 or by reducing its enzymatic activity, both of which stimulate the β -oxidation of fatty acids (51). It seems, therefore, plausible that converting fast-fatigable fibers into slow fatigue-resistant ones render them more resistant to ALS. This phenomenon was observed to occur in mutant SOD1 mice during the course of the disease (104). However, the shift from glycolytic to oxidative metabolism is not without risk. Our more recent studies demonstrated that glycolytic muscle from presymptomatic mutant SOD1 mice switched in fuel preference toward fatty acids but this phenomenon was accompanied by mitochondrial dysfunction and oxidative stress (87), providing further evidence of the selective vulnerability of muscles in ALS.

MULTIPLE PATHWAYS LEAD TO ALS MUSCLE DEGENERATION

Multiple mechanisms have been implicated in the degeneration of skeletal muscle in ALS. The comparison of the effects of overexpressing mutant SOD1 only in muscle and in whole body showed that the atrophy process originated independently of denervation by way of inhibiting the PI3K/Akt pathway and stimulating FOXO3 (31). Down-regulation of the pro-survival Akt pathway was confirmed in muscle biopsies of ALS cases (66, 133). Afterward, atrophy progressed through caspase-dependent apoptosis in parallel to motor neuron degeneration (31). Although initial investigations reported accumulation of mutant SOD1 in skeletal muscle, more recent studies have cast doubts. Indeed, it was observed that mutant SOD1 activated the ubiquitin-proteasome and autophagy systems in muscular C2C12 cells to a greater extent than in the motor neuronal NSC34 cell line. This phenomenon would explain why mutant SOD1 accumulation could not be seen always *in vivo* (21). In the absence of aggregates of mutant enzyme, it was postulated that several as yet unidentified proteins

with aberrant conformation would be in fact responsible for triggering oxidative stress and mitochondrial dysfunction (125). Alternatively, the expression of mutant SOD1 in muscle would rather induce its presymptomatic accumulation inside mitochondria, subsequently causing loss of mitochondrial inner membrane potential and fragmentation of the mitochondrial network (71). Under these circumstances, an excess of calcium release from mitochondrial stores was shown to occur before the onset of symptoms, particularly in fiber segments near the neuromuscular junctions (135). Accompanying these changes, levels of several calcium buffering proteins, such as SERCA and parvalbumin, were shown to be reduced, further reinforcing the progression of the degenerative process (15).

Autophagy is a major intracellular pathway for degradation of misfolded proteins. The expression of several autophagic factors, including LC3, p62 and Beclin-1, increased in muscle of mice overexpressing mutant SOD1 ubiquitously (20, 85) or specifically in muscle (32). However, in contrast to that observed at the level of gene expression, the autophagy flux was unexpectedly low in mutant SOD1 muscle in response to stimulation by starvation. This deficiency was explained by the concomitant caspase-3 dependent cleavage of Beclin-1 that had been found under these conditions (131). An alternative explanation came from studies overexpressing in muscle mutant forms of VCP, a member of the ATPase family implicated in cellular protein homeostasis and degeneration affecting muscles and neurons. Tubular lysosomes in these mutants appeared disrupted, and were not able to fuse with autophagosomes (53). This phenomenon could represent another mechanism by which the activity of the autophagy degradation system would be altered in ALS muscle.

The abnormal accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum activates the unfolded protein response, to restore the physiological equilibrium. However, if the stress persists, the response is aberrantly boosted, and eventually leads to cell death. The unfolded protein response was shown to be stimulated in ALS muscle, since the expression of several factors implicated in endoplasmic reticulum stress, including PERK, IRE1 α , BiP and CHOP, was up-regulated in gastrocnemius of presymptomatic mutant SOD1 mice (14). Moreover, the IRE1 α -dependent pathway was impaired in C2C12 cells transfected with mutant VAPB, which is a cause of familial ALS involved in vesicle trafficking. This occurred in association with a limited capacity to form myotubes, thus suggesting that the dysfunction of the unfolded protein response might interfere with the maintenance of muscle integrity in ALS (115).

HDAC4 is known to play an important role in muscle development and maturation, via the suppression of the stimulatory effect of MEF2 on the transcription of structural and contractile genes. MEF2-dependent gene expression was inhibited by abnormally high levels of HDAC4 observed in muscle of mutant SOD1 mice, a mechanism that would contribute to muscle degeneration (17). In support of this notion, HDAC4 up-regulation in patients' muscle samples negatively correlated with reinnervation and functional outcome (11). Finally, a perturbed metabolism of iron, together with its subsequent accumulation, was also envisaged to play a role in muscle pathology, as deduced from increased amounts of ferritin H that correlated with the progression of disease in mutant SOD1 rats (45).

MUSCLES ARE A PRIMARY SITE FOR THERAPEUTIC INTERVENTION

Beyond the question of whether or not skeletal muscle contributes to ALS, numerous studies have attempted to palliate muscle pathology in itself as a means to counterbalance motor neuron degeneration (Table 1). Based on the presence of mitochondrial dysfunction, early investigations showed that oral supplementation with creatine, given as an energy source, was beneficial to mutant SOD1 mice (59). Follow-up studies, however, did not find any effect, except that the degree of atrophy in EDL was partly diminished (29). Similarly, muscle-restricted expression of PGC-1 α in mutant SOD1 mice was able to increase mitochondrial ATP production and muscle endurance but did not affect lifespan (23). In contrast, stimulation of the β -oxidation of fatty acids by L-carnitine ameliorated motor function and extended survival (57). Highly energetic diets, mainly in the form of elevated lipid content, also prolonged life expectancy, and improved muscle function and motor neuron survival (35, 76, 86).

Some studies performed on muscle biopsies obtained from patients revealed a decrease in the amount of Igf-1, which is a well-known stimulator of growth and development (70). Although this finding was not confirmed in other cohorts (38), interfering with the process of muscle atrophy using growth factors has been another way to fight against ALS. Thus, preclinical investigations conducted on mutant SOD1 mice aimed at increasing the muscle content of Igf-1. This growth factor ameliorated muscle function and increased motor neuron survival in most cases (30, 33, 97), but not always (77). Similar effects were observed with subcutaneous implants of dihydrotestosterone which, indeed, induced muscle expression of Igf-1 (134). Another anabolic steroid derivative called nandrolone also increased muscle mass but only slightly sustained muscle innervation (13). Blocking the activity of the muscle growth inhibitor myostatin promoted muscle mass and strength but did not affect survival (50, 82). More recent studies evaluated the influence of manipulating myogenic factors as a means to keep muscles in health. Strikingly, gene transfer of myogenin into muscle ameliorated motor neuron survival and improved innervation but, in contrast, gene transfer of MyoD aggravated the condition (89). Additional studies also demonstrated beneficial effects on ALS muscle by targeting the response to stress (42) and oxidative damage (119), the stimulation of the contractile apparatus (52, 105) or the inhibition of several cell death pathways (9, 83).

The high levels of several neurotrophins found in muscle samples of ALS patients were interpreted as a compensatory mechanism to prevent motor neuron degeneration (63). Therefore, some therapeutic strategies have proposed that muscles may serve to deliver protective molecules to motor neurons in a retrograde manner. We cannot rule out, however, the possibility that these neuroprotective strategies, although designed in principle to target specifically motor neurons, could, in some cases, exert beneficial actions at the muscle level. The most significant results were achieved by providing motor neurons with GDNF, which is a potent survival factor for these cells. Delivery approaches included the use of retroviral vectors (69, 80, 124), electroporation (132), transgenic muscle-restricted overexpression (67) and intramuscular transplantation of stem cells (61, 91, 111). Neuroprotective effects were also obtained by delivering other neurotrophic factors, such as

Table 1. Experimental approaches with therapeutic potential targeting ALS muscle pathology.

Target	Approach	Model	Survival	Effects	Ref.
Creatine	Oral	SOD1(G93A)	Yes	<ul style="list-style-type: none"> √ oxidative stress √ mitochondrial dysfunction √ motor neuron loss ∧ motor performance 	(45)
Creatine	Oral	SOD1(G93A)	No	<ul style="list-style-type: none"> √ EDL atrophy 	(59)
PGC-1 α	Muscle expression	SOD1(G37R) x MCK/PGC-1 α	No	<ul style="list-style-type: none"> ∧ mitochondrial ATP production ∧ muscle endurance √ muscle degeneration 	(23)
L-carnitine	Injection (s.c.)	SOD1(G93A)	Yes	<ul style="list-style-type: none"> √ myofiber apoptosis √ motor function deterioration 	(29)
HF diet	Oral	SOD1(G86R)	Yes	<ul style="list-style-type: none"> √ muscle denervation ∧ motor neuron survival 	(35)
HF/HC diet	Oral	SOD1(G93A)	Yes	Delayed onset	(76)
Olive oil	Oral	SOD1(G93A)	Yes	<ul style="list-style-type: none"> ∧ MyoD and MyoG expression ∧ LC3 and Beclin-1 expression √ Atf6 and Grp78 expression ∧ myofiber area ∧ motor performance ∧ satellite cell activation ∧ NMJ stabilization ∧ motor neuron survival √ muscle atrophy √ spinal cord inflammation 	(86)
Igf-1	Muscle expression	SOD1(G93A) x MLC/mlgf-1	Yes	<ul style="list-style-type: none"> ∧ satellite cell activation ∧ NMJ stabilization ∧ motor neuron survival √ muscle atrophy √ spinal cord inflammation 	(33)
Igf-1	Muscle expression	SOD1(G93A) x S α A/hIgf-1	No	No effect	(77)
Igf-1	Muscle expression	SOD1(G93A) x MLC/mlgf-1	N/A	<ul style="list-style-type: none"> √ ubiquitin expression √ caspase activity √ p25 accumulation ∧ CDK5 expression ∧ muscle strength ∧ motor neuron survival 	(30)
MGF	Plasmid	SOD1(G93A)	N/A	<ul style="list-style-type: none"> ∧ muscle strength ∧ motor neuron survival 	(97)
DHT	Implant	SOD1(G93A)	Yes	<ul style="list-style-type: none"> ∧ Igf-1 expression √ muscle atrophy √ motor neuron loss ∧ muscle strength ∧ motor function 	(134)
Nandrolone	Injection (s.c.)	SOD1(G93A)	N/A	<ul style="list-style-type: none"> ∧ muscle mass ∧ pre-synaptic activity 	(13)
Myostatin	Antibody	SOD1(G93A)	No	<ul style="list-style-type: none"> ∧ muscle mass ∧ muscle strength √ motor neuron loss 	(50)
Myostatin	ActRIIB injection (i.p.)	SOD1(G93A)	No	<ul style="list-style-type: none"> ∧ muscle mass ∧ muscle strength 	(82)
Myogenin	AAV	SOD1(G93A)	N/A	<ul style="list-style-type: none"> ∧ muscle innervation ∧ motor neuron survival 	(89)
MyoD	AAV	SOD1(G93A)	No	Aggravated phenotype	(89)
Hsp70	Injection (i.p.)	SOD1(G93A)	Yes	<ul style="list-style-type: none"> ∧ innervated NMJ number ∧ motor neuron survival ∧ motor function 	(42)
Nrf2	Muscle expression	SOD1(G93A) x MLC/Nrf2	No	Delayed onset	(119)
Tirasemtiv	Oral	SOD1(G93A)	N/A	<ul style="list-style-type: none"> ∧ forelimb strength ∧ rotarod performance 	(52)
Tweak	Antibody	SOD1(G93A)	No	√ muscle atrophy	(9)
GPNMB	Plasmid	SOD1(G93A)	N/A	<ul style="list-style-type: none"> ∧ myofiber number √ myofiber atrophy 	(83)

“Yes” means an increase in survival while “No” means lack of effect. (∧) = increased effect; (√) = decreased effect; AAV = adeno-associated virus; ActRIIB = soluble activin receptor type IIB; DHT = dihydrotestosterone; GPNMB = glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (osteocytin); HF = high fat; HF/HC = high fat/high carbohydrate; i.p. = intraperitoneal; MGF = mechano-growth factor (Igf-1 splice variant); MLC = myosin light chain; N/A = not applicable; NMJ = neuromuscular junction; S α A = skeletal alpha actin; s.c. = subcutaneous; Tirasemtiv = fast skeletal tropinin activator; Tweak = tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis.

VEGF (61, 58) and cardiotrophin-1 (8), or by suppressing mutant SOD1 overexpression with RNAi (78).

CONCLUSION

As a matter of conclusion, it is recognized that oxidative stress, mitochondrial dysfunction and bioenergetic disturbances are hallmarks of the pathology of ALS muscle. However, the way by which the disease affects myofibers depends on their contractile and metabolic features. The implication of muscle in nourishing the degenerative process is still debated but there exists compelling evidence suggesting that it may play a critical role. Detailed understanding of this contribution could, therefore, lead to the identification of new therapeutic avenues.

ACKNOWLEDGMENTS

Our laboratory regularly receives funds from European Community's Health Seventh Framework Programme under grant agreement No. 259867 (Euro-MOTOR), Thierry Latran Foundation, American Amyotrophic Lateral Sclerosis Association (ALSA), Association Française contre les Myopathies (AFM) and Association de Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique (ARSLA).

REFERENCES

- Al-Sarraj S, King A, Cleveland M, Pradat PF, Corse A, Rothstein JD *et al* (2014) Mitochondrial abnormalities and low grade inflammation are present in the skeletal muscle of a minority of patients with amyotrophic lateral sclerosis; an observational myopathology study. *Acta Neuropathol Commun* **2**:165.
- Artuso L, Zoccollella S, Favia P, Amati A, Capozzo R, Logroscino G, *et al* (2013) Mitochondrial genome aberrations in skeletal muscle of patients with motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **14**:261–266.
- Atkin JD, Scott RL, West JM, Lopes E, Quah AK, Cheema SS (2005) Properties of slow- and fast-twitch muscle fibres in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord* **15**:377–388.
- Barber SC, Shaw PJ (2010) Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* **48**: 629–641.
- Bhattacharya A, Wei R, Hamilton RT, Chaudhuri AR (2014) Neuronal cells but not muscle cells are resistant to oxidative stress mediated protein misfolding and cell death: role of molecular chaperones. *Biochem Biophys Res Commun* **446**:1250–1254.
- Blokhuis AM, Groen EJ, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ (2013) Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* **125**:777–794.
- Bogaert E, d'Ydewalle C, Van Den Bosch L. Amyotrophic lateral sclerosis and excitotoxicity: from pathological mechanism to therapeutic target (2010) *CNS Neurol Disord Drug Targets* **9**: 297–304.
- Bordet T, Lesbordes JC, Rouhani S, Castelnau-Ptakhine L, Schmalbruch H, Haase G, Kahn A (2001) Protective effects of cardiotrophin-1 adenoviral gene transfer on neuromuscular degeneration in transgenic ALS mice. *Hum Mol Genet* **10**: 1925–1933.
- Bowerman M, Salsac C, Coque E, Eiselt É, Deschaumes RG, Brodovitch A, *et al* (2015) Tweak regulates astrogliosis, microgliosis and skeletal muscle atrophy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* **24**:3440–3456.
- Bruneteau G, Bauché S, Gonzalez de Aguilar JL, Brochier G, Mandjee N, Tanguy ML, *et al* (2015) Endplate denervation correlates with Nogo-A muscle expression in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Clin Transl Neurol* **2**:362–372.
- Bruneteau G, Simonet T, Bauché S, Mandjee N, Malfatti E, Girard E, *et al* (2013) Muscle histone deacetylase 4 upregulation in amyotrophic lateral sclerosis: potential role in reinnervation ability and disease progression. *Brain* **136**:2359–2368.
- Capitanio D, Vasso M, Ratti A, Grignaschi G, Volta M, Moriggi M, *et al* (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.
- Cappello V, Vezzoli E, Righi M, Fossati M, Mariotti R, Crespi A, *et al* (2012) Analysis of neuromuscular junctions and effects of anabolic steroid administration in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Mol Cell Neurosci* **51**:12–21.
- Chen D, Wang Y, Chin ER (2015) Activation of the endoplasmic reticulum stress response in skeletal muscle of G93A*SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *Front Cell Neurosci* **9**:170.
- Chin ER, Chen D, Bobyk KD, Mázala DA (2014) Perturbations in intracellular Ca²⁺ handling in skeletal muscle in the G93A*SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **307**:C1031–C1038.
- Chung MJ, Suh YL (2002) Ultrastructural changes of mitochondria in the skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastruct Pathol* **26**:3–7.
- Cohen TJ, Barrientos T, Hartman ZC, Garvey SM, Cox GA, Yao TP (2009) The deacetylase HDAC4 controls myocyte enhancing factor-2-dependent structural gene expression in response to neural activity. *FASEB J* **23**:99–106.
- Cortes CJ, Ling SC, Guo LT, Hung G, Tsunemi T, Ly L *et al* (2014) Muscle expression of mutant androgen receptor accounts for systemic and motor neuron disease phenotypes in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* **82**:295–307.
- Cozzolino M, Carri MT (2012) Mitochondrial dysfunction in ALS. *Prog Neurobiol* **97**:54–66.
- Crippa V, Boncoraglio A, Galbiati M, Aggarwal T, Rusmini P, Giorgetti E *et al* (2013) Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. *Front Cell Neurosci* **7**:234.
- Crippa V, Galbiati M, Boncoraglio A, Rusmini P, Onesto E, Giorgetti E *et al* (2013) Motoneuronal and muscle-selective removal of ALS-related misfolded proteins. *Biochem Soc Trans* **41**:1598–1604.
- Crugnola V, Lamperti C, Lucchini V, Ronchi D, Peverelli L, Prella A *et al* (2010) Mitochondrial respiratory chain dysfunction in muscle from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* **67**: 849–854.
- Da Cruz S, Parone PA, Lopes VS, Lillo C, McAlonis-Downes M, Lee SK *et al* (2012) Elevated PGC-1 α activity sustains mitochondrial biogenesis and muscle function without extending survival in a mouse model of inherited ALS. *Cell Metab* **15**:778–786.
- David G, Nguyen K, Barrett EF (2007) Early vulnerability to ischemia/reperfusion injury in motor terminals innervating fast muscles of SOD1-G93A mice. *Exp Neurol* **204**:411–420.
- de Oliveira GP, Maximino JR, Maschietto M, Zanoteli E, Puga RD, Lima L *et al* (2014) Early gene expression changes in skeletal muscle from SOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis animal model. *Cell Mol Neurobiol* **34**:451–462.
- De Winter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bär PR, Niclou SP, *et al* (2006) The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci* **32**:102–117.

27. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ *et al* (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* **72**:245–256.
28. Dentel C, Palamiuc L, Henriques A, Lannes B, Spreux-Varoquaux O, Gutknecht L *et al* (2013) Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* **136**:483–493.
29. Derave W, Van Den Bosch L, Lemmens G, Eijnde BO, Robberecht W, Hespel P (2003) Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. *Neurobiol Dis* **13**:264–272.
30. Dobrowolny G, Aucello M, Molinaro M, Musarò A (2008) Local expression of mIgf-1 modulates ubiquitin, caspase and CDK5 expression in skeletal muscle of an ALS mouse model. *Neurol Res* **30**:131–136.
31. Dobrowolny G, Aucello M, Musarò A (2011) Muscle atrophy induced by SOD1G93A expression does not involve the activation of caspase in the absence of denervation. *Skelet Muscle* **1**:3.
32. Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S *et al* (2008) Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab* **8**:425–436.
33. Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L *et al* (2005) Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol* **168**:193–199.
34. Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Eschbach J, Rene F, Oudart H *et al* (2009) Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One* **4**:e5390.
35. Dupuis L, Oudart H, René F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP (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 USA* **101**:11159–11164.
36. Echaniz-Laguna A, Zoll J, Ponsot E, N'guessan B, Tranchant C, Loeffler JP, Lampert E (2006) Muscular mitochondrial function in amyotrophic lateral sclerosis is progressively altered as the disease develops: a temporal study in man. *Exp Neurol* **198**:25–30.
37. Echaniz-Laguna A, Zoll J, Ribera F, Tranchant C, Warter JM, Lonsdorfer J, Lampert E (2002) Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients. *Ann Neurol* **52**:623–627.
38. Evans RM, Harridge SD, Velloso CP, Yang SY, Goldspink G, Orrell RW (2010) Investigation of MGF mRNA expression in patients with amyotrophic lateral sclerosis using parallel *in vivo* and *in vitro* approaches. *Amyotroph Lateral Scler* **11**:172–177.
39. Fergani A, Oudart H, Gonzalez De Aguilar JL, Fricker B, René F, Hocquette JF, *et al* (2007) Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Lipid Res* **48**:1571–1580.
40. Fischer-Hayes LR, Brotherton T, Glass JD (2013) Axonal degeneration in the peripheral nervous system: implications for the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **246**:6–13.
41. Galbati M, Onesto E, Zito A, Crippa V, Rusmini P, Mariotti R *et al* (2012) The anabolic/androgenic steroid nandrolone exacerbates gene expression modifications induced by mutant SOD1 in muscles of mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacol Res* **65**:221–230.
42. Gifondorwa DJ, Robinson MB, Hayes CD, Taylor AR, Prevette DM, Oppenheim RW *et al* (2007) Exogenous delivery of heat shock protein 70 increases lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **27**:13173–13180.
43. Gordon T, Tyreman N, Li S, Putman CT, 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.
44. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD *et al* (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**:1772–1775.
45. Halon M, Kaczor JJ, Ziolkowski W, Flis DJ, Borkowska A, Popowska U *et al* (2014) Changes in skeletal muscle iron metabolism outpace amyotrophic lateral sclerosis onset in transgenic rats bearing the G93A hmSOD1 gene mutation. *Free Radic Res* **48**:1363–1370.
46. Halter B, Gonzalez de Aguilar JL, Rene F, Petri S, Fricker B, Echaniz-Laguna A *et al* (2010) Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* **48**:915–923.
47. Han SM, El Oussini H, Scekcic-Zahirovic J, Vibbert J, Cottee P, Prasain JK *et al* (2013) VAPB/ALS8 MSP ligands regulate striated muscle energy metabolism critical for adult survival in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* **9**:e1003738.
48. Hegedus J, Putman CT, 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.
49. Hegedus J, Putman CT, Gordon T (2009) Progressive motor unit loss in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis is unaffected by gender. *Muscle Nerve* **39**:318–327.
50. Holzbaur EL, Howland DS, Weber N, Wallace K, She Y, Kwak S *et al* (2006) Myostatin inhibition slows muscle atrophy in rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **23**:697–707.
51. Hussain G, Schmitt F, Henriques A, Lequeu T, Rene F, Bindler F *et al* Systemic down-regulation of delta-9 desaturase promotes muscle oxidative metabolism and accelerates muscle function recovery following nerve injury. *PLoS One* **8**:e64525.
52. Hwee DT, Kennedy A, Ryans J, Russell AJ, Jia Z, Hinken AC *et al* (2014) Fast skeletal muscle troponin activator tirasemtiv increases muscle function and performance in the B6SJL-SOD1G93A ALS mouse model. *PLoS One* **9**:e96921.
53. Johnson AE, Shu H, Hauswirth AG, Tong A, Davis GW (2015) VCP-dependent muscle degeneration is linked to defects in a dynamic tubular lysosomal network *in vivo*. *Elife* **4**.
54. Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Dimou L, Lin S, Fergani A, Ruegg MA *et al* (2006) The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* **7**:1162–1167.
55. Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Pradat PF, Dupuis L, Echaniz-Laguna A, Muller A *et al* (2005) Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* **57**:553–556.
56. Kieman MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O *et al* (2011) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **377**:942–955.
57. Kira Y, Nishikawa M, Ochi A, Sato E, Inoue M (2006) L-carnitine suppresses the onset of neuromuscular degeneration and increases the life span of mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* **1070**:206–214.
58. Kliem MA, Heeke BL, Franz CK, Radovitskiy I, Raore B, Barrow E *et al* (2011) Intramuscular administration of a VEGF zinc finger transcription factor activator (VEGF-ZFP-TF) improves functional outcomes in SOD1 rats. *Amyotroph Lateral Scler* **12**:331–339.
59. Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA *et al* (1999) Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* **5**:347–350.
60. Kraft AD, Resch JM, Johnson DA, Johnson JA (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.
61. Krakora D, Mulcrone P, Meyer M, Lewis C, Bernau K, Gowing G *et al* (2013) Synergistic effects of GDNF and VEGF on lifespan and

- disease progression in a familial ALS rat model. *Mol Ther* **21**: 1602–1610.
62. Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S, Gellerich FN, Müller T et al (2005) Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. *Brain* **128**: 1870–1876.
 63. Küst BM, Copray JC, Brouwer N, Troost D, Boddeke HW (2002) Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **177**:419–427.
 64. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C et al (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**:1205–1208.
 65. Leclerc N, Ribera F, Zoll J, Warter JM, Poindron P, Lampert E, Borg J (2001) Selective changes in mitochondria respiratory properties in oxidative or glycolytic muscle fibers isolated from G93A human SOD1 transgenic mice. *Neuromuscul Disord* **11**:722–727.
 66. Léger B, Vergani L, Sorarù G, Hespel P, Derave W, Gobelet C et al (2006) Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogin-1. *FASEB J* **20**:583–585.
 67. Li W, Brakefield D, Pan Y, Hunter D, Myckatyn TM, Parsadanian A (2007) Muscle-derived but not centrally derived transgene GDNF is neuroprotective in G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Exp Neurol* **203**:457–471.
 68. Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* **79**:416–438.
 69. Lu YY, Wang LJ, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T et al (2003) Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci Res* **45**:33–40.
 70. Lunetta C, Serafini M, Prella A, Magni P, Dozio E, Ruscica M et al (2012) Impaired expression of insulin-like growth factor-I system in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Muscle Nerve* **45**:200–208.
 71. Luo G, Yi J, Ma C, Xiao Y, Yi F, Yu T, Zhou J (2013) Defective mitochondrial dynamics is an early event in skeletal muscle of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *PLoS One* **8**:e82112.
 72. Mahoney DJ, Kaczor JJ, Bourgeois J, Yasuda N, Tarnopolsky MA (2006) Oxidative stress and antioxidant enzyme upregulation in SOD1-G93A mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve* **33**: 809–816.
 73. Manzano R, Toivonen JM, Calvo AC, Oliván S, Zaragoza P, Rodellar C et al (2013) Altered in vitro proliferation of mouse SOD1-G93A skeletal muscle satellite cells. *Neurodegener Dis* **11**: 153–164.
 74. Manzano R, Toivonen JM, Oliván S, Calvo AC, Moreno-Igoa M, Muñoz MJ et al (2011) Altered expression of myogenic regulatory factors in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* **8**:386–396.
 75. Marcuzzo S, Zucca I, Mastropietro A, de Rosbo NK, Cavalcante P, Tartari S et al (2011) Hind limb muscle atrophy precedes cerebral neuronal degeneration in G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a longitudinal MRI study. *Exp Neurol* **231**:30–37.
 76. Mattson MP, Cutler RG, Camandola S (2007) Energy intake and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromolecular Med* **9**:17–20.
 77. Messi ML, Clark HM, Prevette DM, Oppenheim RW, Delbono O (2007) The lack of effect of specific overexpression of IGF-1 in the central nervous system or skeletal muscle on pathophysiology in the G93A SOD-1 mouse model of ALS. *Exp Neurol* **207**:52–63.
 78. Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, Yamanaka K, Christian LJ, Gage FH, Cleveland DW (2005) Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **57**: 773–776.
 79. Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umapathi P, Arnsen H et al (2006) Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:19546–19551.
 80. Mohajeri MH, Figlewicz DA, Bohn MC (1999) Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Gene Ther* **10**:1853–1866.
 81. Moloney EB, de Winter F, Verhaagen J (2014) ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Front Neurosci* **8**:252.
 82. Morrison BM, Lachey JL, Warsing LC, Ting BL, Pullen AE, Underwood KW et al (2009) A soluble activin type IIB receptor improves function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **217**:258–268.
 83. Nagahara Y, Shimazawa M, Tanaka H, Ono Y, Ohuchi K et al (2015) Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B ameliorates skeletal muscle lesions in a SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* **93**:1552–1566.
 84. Nonneman A, Robberecht W, Van Den Bosch L (2014) The role of oligodendroglial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis Manag* **4**:223–239.
 85. Oliván S, Calvo AC, Gasco S, Muñoz MJ, Zaragoza P, Ostá R (2015) Time-Point Dependent Activation of Autophagy and the UPS in SOD1G93A Mice Skeletal Muscle. *PLoS One* **10**:e0134830.
 86. Oliván S, Martínez-Beamonte R, Calvo AC, Surra JC, Manzano R, Arnal C et al (2014) Extra virgin olive oil intake delays the development of amyotrophic lateral sclerosis associated with reduced reticulum stress and autophagy in muscle of SOD1G93A mice. *J Nutr Biochem* **25**:885–892.
 87. Palamíuc L, Schlagowski A, Ngo ST, Vernay A, Dirrig-Grosch S, Henriques A, 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.
 88. Palma E, Inghilleri M, Conti L, Defflorio C, Frasca V, Manteca A et al (2011) Physiological characterization of human muscle acetylcholine receptors from ALS patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 20184–20188.
 89. Park KH, Franciosi S, Leavitt BR (2013) Postnatal muscle modification by myogenic factors modulates neuropathology and survival in an ALS mouse model. *Nat Commun* **4**:2906.
 90. Park KH, Vincent I (2008) Presymptomatic biochemical changes in hindlimb muscle of G93A human Cu/Zn superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* **1782**:462–468.
 91. Pastor D, Viso-León MC, Botella-López A, Jaramillo-Merchan J, Moraleda JM, Jones J, Martínez S (2013) Bone marrow transplantation in hindlimb muscles of motoneuron degenerative mice reduces neuronal death and improves motor function. *Stem Cells Dev* **22**:1633–1644.
 92. Peled-Kamar M, Lotem J, Wirguin I, Weiner L, Hermalin A, Groner Y (1997) Oxidative stress mediates impairment of muscle function in transgenic mice with elevated level of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:3883–3887.
 93. Philips T, Robberecht W (2011) Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* **10**:253–263.
 94. Pradat PF, Barani A, Wanschitz J, Dubourg O, Lombès A, Bigot A et al (2011) Abnormalities of satellite cells function in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* **12**:264–271.

95. Ramírez-Jarquín UN, Lazo-Gómez R, Tovar-Y-Romo LB, Tapia R (2014) Spinal inhibitory circuits and their role in motor neuron degeneration. *Neuropharmacology* **82**:101–107.
96. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ (2014) State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* **17**:17–23.
97. Riddoch-Contreras J, Yang SY, Dick JR, Goldspink G, Orrell RW, Greensmith L (2009) Mechano-growth factor, an IGF-I splice variant, rescues motoneurons and improves muscle function in SOD1(G93A) mice. *Exp Neurol* **215**:281–289.
98. Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:689–693.
99. Rocha MC, Pousinha PA, Correia AM, Sebastião AM, Ribeiro JA (2013) Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS One* **8**:e73846.
100. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson *et al* (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**:59–62.
101. Russell AP, Wada S, Vergani L, Hock MB, Lamon S, Léger B *et al* (2013) Disruption of skeletal muscle mitochondrial network genes and miRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **49**:107–117.
102. Ryan TE, Erickson ML, Verma A, Chavez J, Rivner MH, Mccully KK (2014) Skeletal muscle oxidative capacity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **50**:767–774.
103. Scaramozza A, Marchese V, Papa V, Salaroli R, Sorarù G, Angelini C, Cenacchi G (2014) Skeletal muscle satellite cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastruct Pathol* **38**:295–302.
104. Sharp PS, Dick JR, Greensmith L (2005) The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* **130**:897–910.
105. Shefner J, Cedarbaum JM, Cudkowicz ME, Maragakis N, Lee J, Jones D *et al* (2012) Safety, tolerability and pharmacodynamics of a skeletal muscle activator in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* **13**:430–438.
106. Siciliano G, D'Avino C, Del Corona A, Barsacchi R, Kusmic C, Rocchi A *et al* (2002) Impaired oxidative metabolism and lipid peroxidation in exercising muscle from ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **3**:57–62.
107. Siciliano G, Pastorini E, Pasquali L, Manca ML, Iudice A, Murri L (2001) Impaired oxidative metabolism in exercising muscle from ALS patients. *J Neurol Sci* **191**:61–65.
108. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B *et al* (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **319**:1668–1672.
109. Stallings NR, Puttapparthi K, Dowling KJ, Luther CM, Bums DK, Davis K, Elliott JL (2013) TDP-43, an ALS linked protein, regulates fat deposition and glucose homeostasis. *PLoS One* **8**:e71793.
110. Staunton L, Jockusch H, Ohlendieck K (2011) Proteomic analysis of muscle affected by motor neuron degeneration: the wobbler mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* **406**:595–600.
111. Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Hayes A, Bellantuono I *et al* (2008) Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Mol Ther* **16**:2002–2010.
112. Suzuki N, Mizuno H, Warita H, Takeda S, Itoyama Y, Aoki M (2010) Neuronal NOS is dislocated during muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **294**:95–101.
113. Thau N, Knippenberg S, Körner S, Rath KJ, Dengler R, Petri S (2012) Decreased mRNA expression of PGC-1 α and PGC-1 β regulated factors in the SOD1G93A ALS mouse model and in human sporadic ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**:1064–1074.
114. Toivonen JM, Manzano R, Oliván S, Zaragoza P, García-Redondo A, Osta R (2014) MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* **9**:e89065.
115. Tokutake Y, Yamada K, Ohata M, Obayashi Y, Tsuchiya M, Yonekura S (2015) ALS-linked P56S-VAPB mutation impairs the formation of multinuclear myotube in C2C12 cells. *Int J Mol Sci* **16**:18628–18641.
116. Turner BJ, Lopes EC, Cheema SS (2003) Neuromuscular accumulation of mutant superoxide dismutase 1 aggregates in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **350**:132–136.
117. Valdez G, Heyer MP, Feng G, Sanes JR (2014) The role of muscle microRNAs in repairing the neuromuscular junction. *PLoS One* **9**:e93140.
118. Van Langenhove T, van der Zee J, Van Broeckhoven C (2012) The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Ann Med* **44**:817–828.
119. Vargas MR, Burton NC, Kutzke J, Gan L, Johnson DA, Schäfer M *et al* (2013) Absence of Nrf2 or its selective overexpression in neurons and muscle does not affect survival in ALS-linked mutant hSOD1 mouse models. *PLoS One* **8**:e56625.
120. Vargas MR, Johnson JA (2010) Astroglial gliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics* **7**:471–481.
121. Vergouts M, Marinangeli C, Ingelbrecht C, Genard G, Schakman O, Sternotte A *et al* (2015) Early ALS-type gait abnormalities in AMP-dependent protein kinase-deficient mice suggest a role for this metabolic sensor in early stages of the disease. *Metab Brain Dis* **30**:1369–1377.
122. Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H *et al* (2000) Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **123**:1339–1348.
123. Vielhaber S, Winkler K, Kirches E, Kunz D, Büchner M, Feistner H *et al* (1999) Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **169**:133–139.
124. Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T *et al* (2002) Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **22**:6920–6928.
125. Wei R, Bhattacharya A, Chintalaramulu N, Jernigan AL, Liu Y, Van Remmen H, Chaudhuri AR (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.
126. Wei R, Bhattacharya A, Hamilton RT, Jernigan AL, Chaudhuri AR (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.
127. Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz WS (1998) Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **156**:65–72.
128. Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, Elliott JL *et al* (2009) MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* **326**:1549–1554.
129. Wong M, Martin LJ (2010) Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet* **19**:2284–2302.

130. Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA *et al* (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.
131. Xiao Y, Ma C, Yi J, Wu S, Luo G, Xu X *et al* (2015) Suppressed autophagy flux in skeletal muscle of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model during disease progression. *Physiol Rep* **3**, pii: e12271.
132. Yamamoto M, Kobayashi Y, Li M, Niwa H, Mitsuma N, Ito Y *et al* (2001) In vivo gene electroporation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) into skeletal muscle of SOD1 mutant mice. *Neurochem Res* **26**:1201–1207.
133. Yin F, Ye F, Tan L, Liu K, Xuan Z, Zhang J *et al* (2012) Alterations of signaling pathways in muscle tissues of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **46**:861–870.
134. Yoo YE, Ko CP (2012) Dihydrotestosterone ameliorates degeneration in muscle, axons and motoneurons and improves motor function in amyotrophic lateral sclerosis model mice. *PLoS One* **7**: e37258.
135. Zhou J, Yi J, Fu R, Liu E, Siddique T, Ríos E, Deng HX (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.

Chapitre 3 : Fused in Sarcoma

FUS pour « Fused in Sarcoma », aussi appelée TLS pour « translated in liposarcoma », est une protéine de liaison à l'ARN appartenant à la famille FET (FUS, EWSR1 et TAF15). Cette protéine est associée à certains cancers quand elle est fusionnée à des facteurs de transcription spécifiques. Des fusions de FUS ont été identifiées dans des sarcomes et des liposarcomes (Croizat et al 1993). La protéine FUS a été pour la première fois associée à la SLA en 2009. Le phénotype lié aux mutations *FUS* est généralement une SLA d'apparition juvénile, avec une progression fulgurante. Les mutations *FUS* peuvent aussi être associées à une apparition tardive et une progression lente de la maladie (Ravits et al 2013).

I. Structure

FUS est une protéine ubiquitaire dont la localisation subcellulaire est majoritairement nucléaire, mais qui reste détectable dans le cytoplasme de nombreux types cellulaires. Elle est notamment présente dans les cellules gliales et les neurones (Andersson et al 2008). Le gène *FUS* est constitué de 15 exons et localisé dans le chromosome 16 (Aman et al 1996). La protéine FUS est composée de 526 acides aminés, avec plusieurs régions connues : une région riche en SYGQ est présente en N-terminal, trois régions riches en arginine-glycine-glycine RGG, un motif de reconnaissance de l'ARN (RRM) un motif en doigts de zinc (ZnF). La protéine est essentiellement nucléaire grâce à la présence d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) comportant une proline et une tyrosine C terminales (PY-NLS) (Dormann & Haass 2013, Morohoshi et al 1998). Cette séquence de localisation nucléaire permet l'association de FUS avec les transportines assurant ainsi la navette entre le cytoplasme et noyau (Lee et al 2006). Dans la SLA de nombreuses mutations dans cette NLS sont à l'origine d'une perte de FUS dans le noyau et par conséquent, une accumulation de FUS dans le cytoplasme (Bosco et al 2010a, Dormann et al 2010).

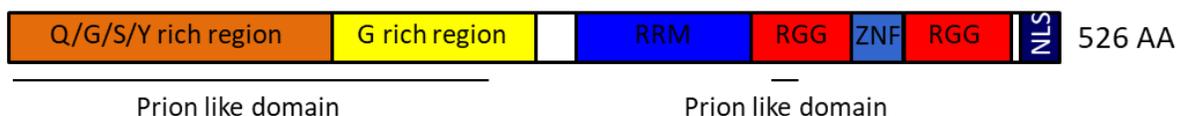


Figure 21 : Structure de FUS.

La protéine FUS est composée d'une région riche en QGSY, de trois régions riches en glycine glycine (RGG), d'un domaine de liaison à l'ARN (RRM), d'un domaine en doigt de zinc (ZNF) et d'une séquence de localisation nucléaire (NLS). Image tirée de (Shang & Huang 2016).

II. Rôle de Fus

FUS est une protéine complexe, impliquée dans de nombreuses étapes du métabolisme de l'ARN (de l'épissage à la traduction en passant par sa transcription et son transport) ainsi que dans la réparation de l'ADN.

II.1. Réparation de l'ADN

La survie cellulaire dépend du maintien de son information génétique. La réparation de l'ADN est donc un processus capital car elle permet de reconnaître puis de corriger les ADN endommagés. FUS est **capable de se lier à l'ADN** endommagé. En effet, plusieurs études ont montré que FUS se lie à des ADN simples ou doubles brins, à des D-loop grâce à son motif RRM ou grâce à son motif en doigt de zinc (Baechtold et al 1999, Dejardin & Kingston 2009, Liu et al 2013). FUS a également la capacité de **moduler la longueur des télomères**, des séquences d'ADN retrouvées aux extrémités des chromosomes permettant de les protéger. D'un côté, FUS se lie aux ADN télomériques et d'un autre côté, une surexpression de FUS induit la méthylation des histones qui raccourcissent la longueur des télomères (Takahama et al 2013). Enfin Fus est **requis pour deux mécanismes de réparation de l'ADN** : la réparation par recombinaison homologue (RH) et par jonction des extrémités non homologues (JENH). Un knock-down de FUS entraîne une diminution de 30 à 50% de ces deux mécanismes (Mastrocola et al 2013, Wang et al 2013). Après un dommage à l'ADN, FUS est recruté aux sites de lésion de façon dépendante de la poly-ADP-ribose polymérase (Rulten et al 2014), et contribue à la réparation de l'ADN via la protéine HDAC1 (Wang et al 2013). Les mutations de FUS perturbent cette fonction (Qiu et al 2014, Wang et al 2013).

II.2. Transcription

FUS joue un rôle important dans la transcription en raison de sa capacité à se lier à des complexes et des enzymes impliqués dans la transcription des ARN messager, notamment la RNA polymérase II elle-même. En effet, FUS est **associé avec le complexe transcriptionnel TFIID**

et l'ARN polymérase II (Bertolotti et al 1996) et régule la phosphorylation de la sérine 2 du C-terminal repeat domain (CTD) de l'ARN polymérase 2, ce qui altère son activité transcriptionnelle (Schwartz et al 2012). D'autres études ont montré que FUS agit comme un **co-activateur de la transcription** notamment des récepteurs hormonaux nucléaires (Tan & Manley 2010), de NF κ B (Uranishi et al 2001), de facteurs de transcription comme RUNX (Li et al 2010). Plus récemment, l'étude de Raczynska en 2015 a montré que FUS favorise le recrutement de l'ARN polymérase II et la transcription des ARN messager des histones (Raczynska et al 2015). Toutefois, FUS peut aussi agir comme un **inhibiteur de la transcription**. Son effet inhibiteur a notamment été constaté sur la cycline D1, et passe par un ARN non codant (Wang et al 2008). FUS est aussi capable d'inhiber la transcription dépendante de l'ARN polymérase III (Tan & Manley 2010). Enfin, les mutations de *FUS* dans la SLA empêchent la transcription de plusieurs gènes (Kwiatkowski et al 2009, Vance et al 2009).

II.3. Épissage

L'épissage est un processus permettant de cliver les introns dans le but d'obtenir un ARN messager mature. Il est réalisé grâce à un complexe ribonucléique, le splicéosome, composé de plusieurs sous-unités de petites ribonucléoprotéides nucléaires (snRNP). Des études ont montré que FUS **s'intègre au splicéosome** en interagissant directement les snRNP U1, U11, U12 ou avec Survival Motor Neuron (SMN) qui a un rôle majeur dans la maturation des snRNP (Germino et al 2013, Groen et al 2013, Hackl & Luhrmann 1996, Sun et al 2015, Yamazaki et al 2012). Par ailleurs, l'étude de Lagier-Tourenne et collaborateurs en 2012 a montré que FUS est capable de se **lier directement aux introns de long pré ARN messagers**. Une des particularités de FUS est qu'il **régule son propre épissage** en réalisant un épissage alternatif de l'exon 7 de son propre ARNm (Lagier-Tourenne et al 2012, Zhou et al 2013), mais il **régule aussi l'épissage d'autres gènes impliqués dans des maladies neurodégénératives** tel que MAPT. En effet, FUS régule l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 de la protéine TAU dont les mutations sont associées à des démences fronto-temporales (Hutton et al 1998, Ishigaki et al 2017, Orozco et al 2012). De façon plus générale, une perte de FUS dans le cerveau de souris ou dans des cellules IPS (Induced pluripotent stem cells) dérivées en neurones **altère l'épissage de centaines de gènes** (Ederle & Dormann 2017). Le rôle de FUS dans l'épissage est donc clairement établi.

Cependant, la pertinence de ce rôle et des conséquences de son dysfonctionnement dans la SLA reste à établir, de même que les cibles potentiellement critiques.

II.4. Synthèse de l'ARN

FUS **contrôle la synthèse des microARN** grâce à son association avec le complexe Drosha. Lors de la fabrication des microARN, les pre-miARN sont clivés par la ribonucléase III, Drosha, puis sont pris en charge par l'endoribonuclease, DICER, qui réalise le dernier clivage aboutissant à des microARN qui ne sont plus traduits. FUS facilite donc la biogénèse des microARN en recrutant Drosha sur les sites actifs de la transcription des microARN (Morlando et al 2012). Des études ont d'ailleurs montré un effet de Fus sur plusieurs microARN tels que miR-9, miR-125b, miR-132, miR141 ou encore miR200a (Dini Modigliani et al 2014, Morlando et al 2012). FUS contrôle également la **biogénèse des longs ARN non codants** notamment MALAT1 et NEAT1 (Lourenco et al 2015).

II.5. Stabilité de l'ARN

En addition de son rôle dans la fabrication de l'ARN, FUS est également capable de **maintenir la stabilité des ARNm**. En 2015, l'étude de Udagawa et collaborateurs montre une régulation par FUS de la stabilité du gène *GluA1* qui code pour une sous-unité des récepteurs AMPA (Udagawa et al 2015). Plus récemment, l'étude de Kapeli et collaborateurs en 2016 a montré que FUS stabilise 330 transcrits et déstabilise 44 transcrits dans les cellules progénitrices neurales humaines.

II.6. Transport de l'ARN

En condition physiologique, FUS est exprimé principalement dans le noyau des cellules (Zinszner et al 1997) grâce à sa NLS qui permet son import nucléaire (Dormann et al 2010). À l'inverse, l'export de FUS du noyau vers le cytoplasme nécessite sa méthylation sur un certain nombre d'arginines (Dormann et al 2012, Tradewell et al 2012). Cette navigation de FUS entre les deux compartiments lui permet d'avoir un rôle de transporteur d'ARN. L'étude de Kanai et

collaborateurs en 2004 a montré que FUS est un composant des granules de transport isolées à partir de cerveaux de souris (Kanai et al 2004). Il joue également un rôle important dans le transport de l'ARN au sein des dendrites neuronales. En effet, FUS transporte l'ARNm de Nd1-L codant pour une protéine de stabilisation de l'actine dans les dendrites et les épines dendritiques (Fujii & Takumi 2005).

II.7. Traduction

L'apport d'ARNm par FUS dans le cytoplasme et la présence de FUS dans ce compartiment semblent important pour la traduction. Bien que son implication dans la traduction soit encore peu documentée, il a été montré que FUS est responsable de la traduction de Nd1-L dans les épines dendritiques et de la traduction des complexes ribonucléoprotéiques des cellules de protrusion à l'intérieur de ses granules cytoplasmiques (Fujii & Takumi 2005, Yasuda et al 2013).

FUS est donc une protéine de liaison à l'ARN qui joue un rôle crucial dans de nombreuses étapes du métabolisme de l'ARN aussi bien grâce à sa partie C-terminale permettant la liaison de l'ARN que grâce à sa partie N-terminale assurant l'activation de la transcription et le transport de l'ARN. En raison de son implication dans de nombreux processus physiologiques dont le bon fonctionnement est essentiel à la survie de la cellule, des mutations au sein du gène *FUS* pourraient avoir des conséquences sévères telles que le développement de la SLA.

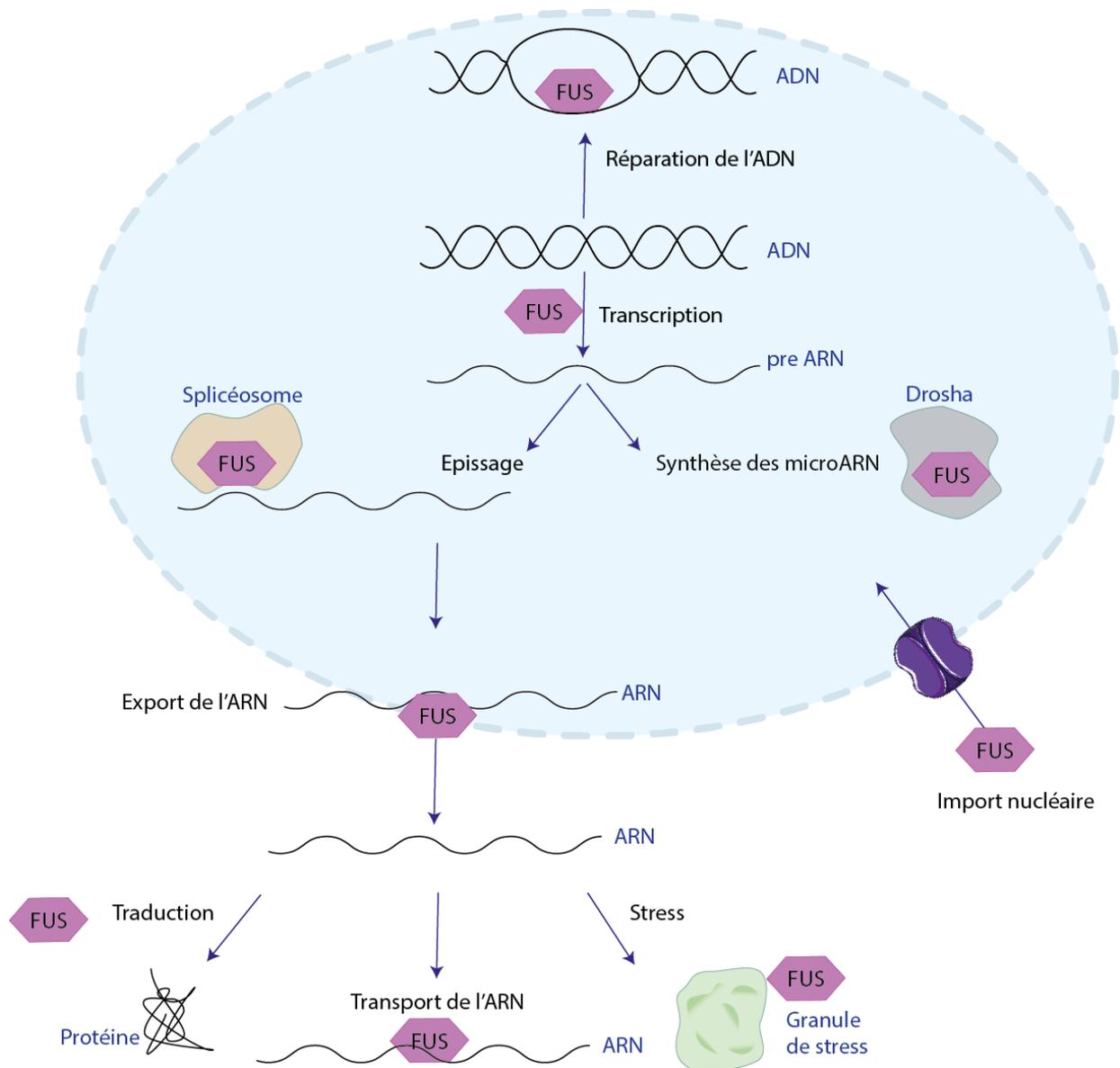


Figure 22 : Les fonctions physiologiques de FUS

FUS se lie à l'ADN et participe ainsi à sa réparation et à sa transcription. Il s'associe également au splicéosome ou au complexe Drosha pour réaliser l'épissage et la synthèse des microARNs. Grâce à sa NLS, FUS navigue entre le noyau et le cytoplasme et cette capacité lui confère un rôle dans le transport de l'ARN. Enfin, FUS est impliquée dans la traduction et la formation des granules de stress.

III. La SLA liée à la pathologie *FUS*

III.1. Les mutations *FUS* dans la SLA

De nombreuses mutations (plus de 50) ont été identifiées dans le gène *FUS*, ce qui correspond à environ 4% des formes familiales de SLA et probablement 1% des cas sporadiques. Les porteurs de mutations *FUS* sont répartis sur tout le globe et vivent aussi bien en Amérique du Nord, Europe, Australie, Afrique et Asie. La majorité des mutations *FUS* dans la SLA sont des **mutations faux sens** (Rademakers et al 2010, Vance et al 2009). Cependant, des **mutations troncatoires** ou **non-sens**, telle que R495X, ont également été rapportées (Zhou et al 2013). Toutes les mutations de *FUS* sont regroupées dans deux régions de la protéine. Tout d'abord, la **première zone de mutation concerne les exons 12 à 15** qui codent pour le motif en doigt de zinc, la RGG2, la RGG3 et la NLS. La **deuxième zone de mutations se situe au niveau des exons 3 à 6** qui codent pour la région QGSY et RGG1. Les mutations en C-terminale sont pathogéniques et plus particulièrement, les mutations de la NLS induisent une forme très sévère de la SLA (Dormann et al 2010, Vance et al 2013). Elles affectent des personnes âgées d'une vingtaine d'années et entraînent leur décès dans les 6 mois suivant le diagnostic de la maladie (Baumer et al 2010, Waibel et al 2013). Dans les SLA liées à *FUS*, la maladie est toujours due à une mutation de *FUS* contrairement aux DFT liées à *FUS*, qui se développent en l'absence de mutations germinales de *FUS* (Neumann et al 2009b).

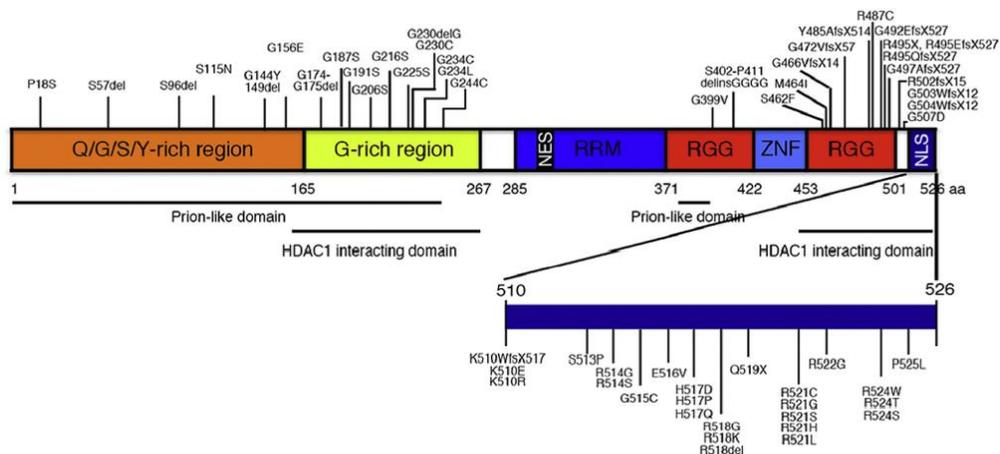


Figure 23 : Structure de *FUS* et ses mutations dans la SLA

Les mutations de *FUS* dans la SLA sont majoritairement localisées dans la partie C-terminale au niveau de la troisième région riche en glycine (RGG) et la séquence de localisation nucléaire (NLS). Image tirée de (Shang & Huang 2016).

III.2. Accumulation de FUS dans le cytoplasme

Lors du développement d'une SLA liée à une mutation de *FUS*, une diminution du marquage FUS dans le noyau est observée suggérant un défaut de l'import nucléaire (Dormann & Haass 2011). Par ailleurs, de nombreuses mutations induisent un **défaut dans la NLS ou sa troncation entière** ce qui conduit à une accumulation de FUS dans le cytoplasme (Bosco et al 2010a, Dormann et al 2010, Scekcic-Zahirovic et al 2016). Ces mutations **empêchent la liaison de FUS à la transportine-1** ce qui bloque son transport dans le noyau (Dormann et al 2010). De façon très intéressante, aucun défaut d'import nucléaire d'EWS et TAF15 n'est présent dans les SLA-FUS. L'étude de Dormann et collaborateurs en 2012, montre que le **domaine RGG3 non méthylé de FUS se lie fortement à la Transportine-1** et pourrait ainsi compenser la perte de l'import nucléaire de FUS en réponse à une mutation ponctuelle dans la PY-NLS. Le taux de méthylation serait donc un bon indicateur de la quantité de FUS importé dans le noyau et par conséquent, un bon indicateur de la sévérité de la maladie.

Plusieurs études ont caractérisé la méthylation de FUS dans la SLA. L'étude de Scekcic-Zahirovic et collaborateurs en 2017 a montré une augmentation nucléaire et cytoplasmique de FUS asymétriquement diméthylée dans la moelle épinière de souris SLA-FUS (Scekcic-Zahirovic et al 2017). Il a également été montré qu'il n'y a **pas d'inclusions de FUS mono ou non méthylé dans la SLA**, contrairement à ce qui est observé chez les patients DFT-FUS (Suarez-Calvet et al 2016). Par ailleurs, FUS sauvage comme muté (R521C, R521G et R521H) sont **hyperméthylés dans la SLA (Tradewell et al 2012)**. La méthyle transférase responsable de ces méthylations de l'arginine est **PRMT1**. En effet, la perte de PRMT1 augmente la quantité de FUS mono ou non méthylé et diminue la quantité de FUS présentant une diméthylation asymétrique (Suarez-Calvet et al 2016). Toutes ces études montrent que FUS interagit et est un substrat de PRMT1. La méthylation de l'arginine contribue alors à la toxicité liée à FUS dans la SLA en entraînant une localisation cytoplasmique aberrante.

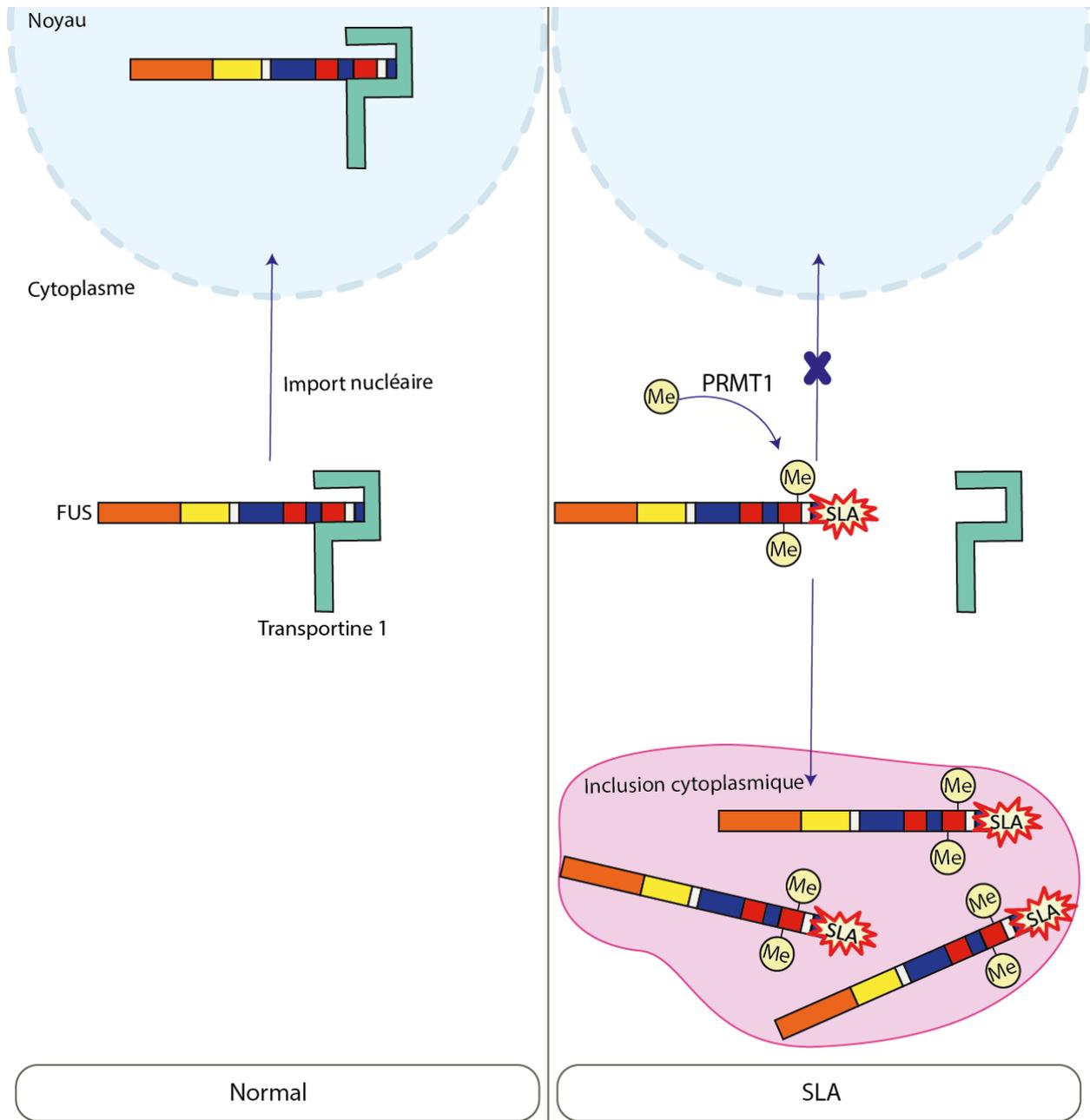


Figure 24 : Accumulation de FUS dans le cytoplasme au cours de la SLA. La séquence de localisation nucléaire (NLS) et la troisième région riche en glycine glycine de FUS, lui permettent de se lier à la transportine 1 et ainsi de rentrer dans le noyau. En cas de SLA, les mutations dans la NLS et l'hyperméthylation de RGG3 par PRMT1 empêchent l'import nucléaire de FUS et entraînent la formation d'inclusions cytoplasmiques. Adaptation de (Dormann et al 2012, Suarez-Calvet et al 2016)

III.3. Agrégats cytoplasmiques de FUS et granules de stress

Nous venons de voir que la perte de l'import nucléaire de FUS dans la SLA peut être la conséquence d'un défaut de la liaison de FUS à la transportine-1 normalement assuré *via* sa séquence NLS. Toutefois, un autre mécanisme responsable de la perte nucléaire de FUS est sa séquestration sous forme **d'inclusions cytoplasmiques**. En effet, les agrégats de FUS sont aussi bien caractéristiques des SLA que des DFT liées à FUS. De nombreuses inclusions de FUS sont présentes dans les neurones et les glies des patients (Suzuki et al 2012). Ces fragments cytoplasmiques peuvent être composés de **FUS insoluble** (Miguel et al 2012). Par ailleurs, les inclusions cytoplasmiques de FUS P525L dans les neurones ainsi que les inclusions cytoplasmiques neuronales et gliales de FUS R521C sont basophiles (Mackenzie et al 2011). À l'inverse, les inclusions cytoplasmiques de FUS R521G, R521H, R524W, G507N sont présentes en l'absence d'inclusions basophiles (Kwiatkowski et al 2009, Suzuki et al 2010, Vance et al 2009).

Plusieurs études ont caractérisé la composition de ces inclusions et ont montré que les inclusions cytoplasmique de FUS contiennent de **l'ubiquitine, p62 ou encore TDP-43** dans la moelle épinière de patient SLA-FUS (Deng et al 2010, Kwiatkowski et al 2009, Vance et al 2009). Plus récemment, il a été montré que FUS n'est pas méthylé dans les inclusions intranucléaires (Dormann et al 2012).

Enfin, dans les SLA liées aux mutations *FUS*, des granules de stress sont identifiées dans des conditions de stress oxydatifs, de choc thermique ou de stress du réticulum endoplasmique (Bentmann et al 2012, Bosco et al 2010a, Vance et al 2013). À l'intérieur de ces **granules de stress** peuvent se retrouver aussi bien FUS sauvage que les mutants FUS (Bosco et al 2010a, Dormann et al 2010, Vance et al 2013). L'étude de Dormann et collaborateurs en 2010, montre que les **mutations C-terminales favorisent le recrutement de FUS dans les granules de stress cytosoliques** et à plus long terme, ce stress pourrait engendrer des **inclusions de FUS pathologiques**. Cela suggère que ces granules de stress font parties intégrante du mécanisme pathologique lié à FUS dans la SLA.

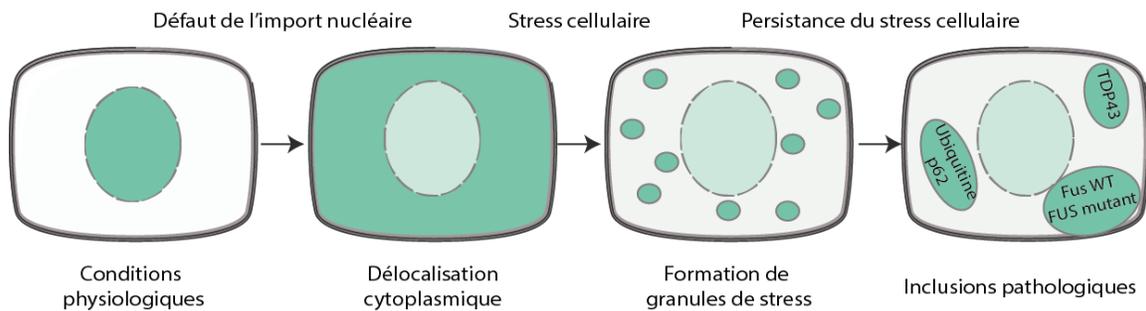


Figure 25 : Agrégats FUS au cours de la SLA.

Dans les SLA liées à FUS, les mutations dans la partie C terminale entraînent une accumulation cytoplasmique de FUS puis un recrutement dans des granules de stress. Si ce stress persiste, il y a formation d'inclusions pathologiques contenant FUS, TDP-43, ubiquitine et p62. Adaptation de (Dormann et al 2010).

III.4. Altération du métabolisme de l'ARN

Nous avons précédemment discuté du rôle de FUS dans le métabolisme de l'ARN et notamment dans la transcription. Les mutations de FUS dans la SLA entraînent des défauts transcriptionnels puisque qu'une absence de FUS a comme conséquence un blocage de la transcription (Hill et al 2016). De façon très intéressante, cette même étude a montré que FUS est localisée sur les sites de transcription associés à un dommage de l'ADN. Par ailleurs, Wang et collaborateurs avaient montré que les NM atteints dans la SLA présentent des dommages et des défauts de réparation de l'ADN (Wang et al 2013). Des études ont montré que les mutations de FUS sont associées à des dommages de l'ADN. En effet, des souris FUS à un stade symptomatique présentaient une élévation du taux de marqueurs de dommages de l'ADN tels que gH2AX, p53 et ATF3 dans le système nerveux central (Qiu et al 2014, Wang et al 2013). In vitro, plusieurs mutations de FUS présentent des altérations dans les mécanismes de réparation par recombinaison homologue et par jonction des extrémités non homologues. Enfin FUS interagit avec HDAC1 dans le cadre d'une réparation de l'ADN et dans la SLA, les mutations de FUS modifient son interaction avec HDAC1. Des cultures de neurones primaires transfectées avec R244C, R514S, H517Q et R521C montrent une diminution de l'interaction FUS/HDAC1 associé à une altération de la réparation de l'ARN (Qiu et al 2014, Wang et al 2013). Enfin, les mutations de FUS altèrent aussi l'épissage dans la SLA. Par exemple, la mutation FUS altère l'épissage de l'exon 5 de BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) dans le cerveau de souris FUS R521C (Qiu et al 2014).

IV. Modèles animaux de SLA basés sur la mutation de *FUS*

Depuis 2009, de nombreuses mutations de *FUS* ont été associées à la SLA. Celles-ci sont majoritairement localisées au niveau de la NLS entraînant ainsi une perte de l'import nucléaire et une accumulation cytoplasmique de *FUS*. La génération de modèles animaux permet de comprendre les mécanismes provoqués par une mutation de *FUS* en vue de la mise au point d'un traitement pour cette forme sévère de SLA. Des modèles animaux murins ou non, ont été mis au point. Ils reproduisent la perte de fonction, le gain de fonction ou la combinaison perte/gain de fonction de *FUS*. Ces avancées majeures ont permis d'étudier les altérations des voies moléculaires causant l'agrégation de *FUS*, la dégénérescence des neurones moteurs ou encore l'altération du génome. Il n'est pas possible d'être exhaustif dans cette partie. Je détaillerai uniquement les modèles qui ont contribué significativement à l'avancée des connaissances actuelles sur les mécanismes pathologiques de la SLA-*FUS*.

IV.1. Modèles de perte de fonction de *Fus*

Les premières souris génétiquement modifiées sur le gène *Fus* ont été créées, avant la découverte de mutations *FUS* dans la SLA, avec pour objectif d'étudier l'effet d'une perte de fonction de *Fus*. La première étude analysant la conséquence d'une déficience de *Fus* a été réalisée par Hicks et collaborateurs en 2000. Il s'agit d'un knock-out de *Fus*, dont l'impact a lieu à partir de l'exon 12. Cette mutation très sévère entraîne la mort des souris homozygotes qui, en raison de leur incapacité à téter, meurent dans les 16h suivant la naissance. Ces souris sont plus petites et présentent une atrophie du thymus tandis que le développement embryonnaire semble relativement normal. Enfin, cette première étude montre que *Fus* influence le **développement des lymphocytes B et la stabilité génomique**. En effet, les nouveaux nés homozygotes présentent une réduction du nombre de globules blancs et des anomalies chromosomiques (Hicks et al 2000).

La deuxième étude de l'inactivation de *Fus* est l'étude de Kuroda et collaborateurs en 2000. Cette étude analyse le **système reproducteur** de souris présentant une interruption de la région codante dans l'exon 8 de *Fus*. Le knock-out de *Fus* chez ces souris n'entraîne pas de problème développemental, mais induit des défauts de spermatogenèse et des défauts de **réparations**

des ADN endommagés. En effet, l'étude a montré que ces souris sont sensibles à des radiations ionisantes causant des dommages à l'ADN. Ainsi, les souris sauvages exposées à des radiations ionisantes vivent 28 jours tandis que les souris mutées ne vivent que 18 jours dans les mêmes conditions (Kuroda et al 2000).

Par la suite, Kino et collaborateurs en 2012 ont réutilisé le modèle de Hicks et collaborateurs, mais cette fois dans le cadre d'une étude de la SLA. La mortalité périnatale de ces souris a été évitée par l'introduction d'un fonds génétique mixte, permettant d'étudier les conséquences d'une perte de *FUS* à l'âge adulte. Ces souris présentent une **perte de poids**, une hyper activité ainsi que des problèmes comportementaux. Les tests du labyrinthe surélevé et de la chambre claire - obscure ont montré une diminution de l'**anxiété** chez les souris mutées. Cependant, le test du rotarod ou du champ ouvert n'ont mis en évidence aucun phénotype moteur. Enfin, l'analyse des exons a souligné une altération de l'expression de plus de 100 gènes dans le striatum et la moelle épinière des souris KO *Fus* (Kino et al 2015).

Ces modèles ont permis une première caractérisation d'une déplétion de *FUS*. Toutefois, il est difficile d'identifier l'origine des symptômes observés. Il faut aussi mentionner que ces deux lignées ne sont pas des KO complets, car l'ablation du gène a lieu après l'exon 8 (Kuroda et al 2000) et 12 (Hicks et al 2000), ce qui est susceptible de maintenir une protéine dépourvue de séquence NLS (Scekic-Zahirovic et al 2016). Les conséquences phénotypiques de la perte de *FUS* dans ces modèles animaux sont donc à interpréter avec précaution.

En 2015, Frickenhaus et collaborateurs ont utilisé la drosophile comme modèle d'étude (Frickenhaus et al 2015). L'avantage de ce modèle est son espérance de vie courte (50 jours), sa reproduction facile et rapide ainsi que son système nerveux bien documenté et relativement complexe constitué de 100 000 neurones (Pandey & Nichols 2011). Dans ce modèle, des systèmes CRE-loxP et FRT-FRP ont été utilisés pour induire spécifiquement l'excision des exons 2 à 7 de *Caz* (homologue de *Fus* chez la drosophile) dans les neurones ou le muscle. L'inactivation de *Caz* dans les neurones engendre une **diminution de la survie** et un **défaut des performances motrices**. Par ailleurs, la perte de *FUS* neuronale n'est pas suffisante pour induire la dégénérescence des neurones moteurs chez l'adulte. L'inactivation de *Caz* dans le muscle,

quant à elle, altère la morphologie du muscle, plus précisément sa largeur, mais pas sa longueur. Ici aussi, en dépit de son intérêt, ce modèle est limité dans son interprétation : en effet, *Caz* est le seul homologue pour les 3 gènes de la famille de *FET* (*FUS*, *EWSR1*, *TAF15*). Ce modèle permet donc de comprendre les conséquences d'une perte totale des protéines FET, mais n'est pas sélectif de *FUS*.

Ces modèles constituent une bonne approche dans la compréhension de la maladie cependant, ils ne sont pas suffisants pour causer la SLA. L'absence de neurodégénérescence associée à un phénotype moteur nécessite la mise au point de nouveaux modèles animaux.

IV.2. Modèles de gain de fonction de *Fus*

Afin d'étudier rapidement les altérations induites par le gain de fonction de *Fus*, l'utilisation d'un système simplifié est requis. Un modèle cellulaire particulièrement utilisé est celui de la levure. En effet, en 2011 Fushimi et collaborateurs, ont réalisé une surexpression de FUS R524S ou P525L. Grâce à cette surexpression, la **formation d'agrégats** de mutant FUS et leur toxicité dans la levure a été mise en évidence. De façon très intéressante, il a été montré que l'expression du domaine N-terminal est suffisant pour induire l'agrégation, et de nombreux gènes modifiant la toxicité de FUS dans la levure ont été identifiés (Fushimi et al 2011). L'étude de Gitler et collaborateurs en 2011, a confirmé la présence d'agrégats FUS chez la levure surexprimant différentes troncations de FUS. De plus, il a été montré que les domaines « prion-like » et RGG sont requis pour la formation d'agrégats (Gitler & Shorter 2011). Cependant, il s'agit ici d'un modèle pur « gain de de fonction », car la levure ne possède pas d'homologue pour FUS. De ce fait, il est aussi possible que les résultats obtenus ne soient pas physiologiques, car l'organisme ne contient pas de protéines similaires.

Une étude dans un modèle plus complexe a étudié l'agrégation de FUS en utilisant le poisson-zèbre qui a la particularité de posséder des embryons transparents. De plus, la plupart des gènes humains ont un homologue chez le poisson-zèbre, et c'est notamment le cas de *FUS* (Phillips & Westerfield 2014). Cette étude a montré que l'injection de FUS H517Q, R521G, R495X et G515X dans les œufs de poisson zèbre entraîne l'accumulation de FUS sous forme de **granules de stress cytoplasmiques** chez les embryons (Bosco et al 2010a).

Les protéines de liaisons à l'ARN impliquées dans la SLA pourraient donc s'incorporer et altérer les granules de ribonucléoprotéines. L'identification du procédé par lequel les mutants Fus altèrent la formation des granules permettrait de comprendre les mécanismes moléculaires entraînant la neurodégénérescence. Murakami et collaborateurs en 2012 ont mis au point un modèle *C. elegans* et ont analysé les mécanismes responsables de la toxicité. *Caenorhabditis elegans* est un ver nématode qui possède un système nerveux simple (302 neurones) et a l'avantage d'avoir une durée de vie extrêmement courte (4 jours). Il est par ailleurs facile à manipuler génétiquement. Cette capacité a été utilisée pour surexprimer FUS R514G, R521G, R522G, R524S ou P525L sous le contrôle du promoteur neuronal Prgef-1 (Murakami et al 2012). Ils ont montré que la faible complexité de la partie N terminale est impliquée dans la toxicité neuronale liée aux mutations *FUS*. En effet, les mutations de *FUS* altèrent la capacité de la protéine FUS à former un hydrogel stable et aboutissent à un **état fibrillaire irréversible** qui piège d'autres ribonucléoprotéines puis altère la fonction des granules d'ARN (Murakami et al 2015). Ce mécanisme pathologique pourrait alors expliquer le développement de neurodégénérescence dans la SLA. Cependant, ce modèle ne présente pas de perte des neurones moteurs.

Lanson et collaborateurs, en 2011, ont surexprimé les mutations FUS R521C et R521H humaines dans l'œil de la drosophile et observé une **neurodégénérescence** caractérisée par la perte des poils mécano-sensoriels de l'œil et une perte des ommatidies (ensemble des récepteurs sensibles à la lumière chez les drosophiles) (Lanson et al 2011). De plus, les mutants Fus induisent une augmentation de la **mortalité** et de sévères **déficits moteurs**. Une **altération de la jonction neuromusculaire** à l'origine d'un **défaut d'éclosion** est également observée dans ce modèle. Enfin, les mutant FUS sont présents aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. Dans le but d'étudier l'importance de la localisation de Fus dans la SLA, une délétion de la séquence d'export nucléaire a été effectuée. Cette délétion bloque la toxicité associée aux mutants Fus, à savoir, elle supprime le défaut d'éclosion et la neurodégénérescence. Cela montre alors **l'importance du transport nucléocytoplasmique dans la SLA**.

Le modèle utilisé par Mitchell et collaborateurs en 2013 confirme le phénotype observé dans les précédentes études (Mitchell et al 2013). L'utilisation de souris transgéniques surexprimant FUS

sauvage humain sous le contrôle d'un promoteur du système nerveux central PrP (protéine prion) engendre un phénotype très sévère causant une perte de poids de 25% et le décès des souris homozygotes en 12 semaines. Ces souris présentent un déficit moteur caractérisé par une paralysie progressive des membres postérieurs, une diminution de la force musculaire et de la locomotion, une atrophie musculaire et une dénervation. La nouveauté de cette étude est que la surexpression de FUS entraîne des **tremblements** à un stade précoce de la maladie (4 semaines) chez les homozygotes, l'apparition de **problèmes de relaxation** musculaire et d'une **diminution de la force de contraction chez les hétérozygotes**. Par ailleurs cette accumulation cytoplasmique de Fus entraîne la formation d'agrégats de FUS dans la moelle épinière. La conséquence est la **perte des neurones moteurs α** associée à une astroglie et une microglie dans la corne antérieure de la moelle épinière lombaire des souris hétérozygotes. Depuis l'étude de Mitchell et collaborateurs, d'autres études ont mis en évidence une **neuroinflammation** (Qiu et al 2014, Shelkownikova et al 2013). En effet, l'étude de Shelkownikova et collaborateurs en 2013 qui utilise un modèle surexprimant FUS humain sans NLS sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1 a notamment montré une neuroinflammation dans la moelle épinière et le tronc cérébral des souris transgéniques. De même que l'étude de Qiu et collaborateurs en 2014 montre une augmentation de la microglie et une faible astroglie dans la corne antérieure de la moelle épinière. Ces modèles de surexpression montrent que la protéine FUS, qu'elle soit sauvage ou mutée, est toxique quand elle est surexprimée dans les neurones. Les conclusions de ces études restent cependant limitées par la toxicité importante des formes sauvages (parfois supérieure à la toxicité de la forme mutée). De plus, la surexpression de FUS provoque des interférences avec l'autorégulation de son gène. La pertinence de ces études pour une maladie où une seule copie est mutée est donc incertaine.

IV.3. Modèles combinant la perte et le gain de fonction de *Fus*

Les modèles décrits précédemment constituent une première approche pour explorer les mécanismes pathologiques de la SLA-FUS. Certains phénotypes de la perte ou du gain de fonction de FUS ont pu être mis en évidence. Mais qu'en est-il lorsqu'un organisme possède à la fois un gain et une perte de fonction ? Dans quelle mesure les différents phénotypes sont-ils la conséquence d'une combinaison de la perte de fonction nucléaire et du gain de fonction cytoplasmique ?

L'étude de Kabashi et al 2011 a tenté de répondre à cette question en modifiant génétiquement un poisson-zèbre (Kabashi et al 2011). Il est possible de surexprimer FUS R521H, R521C, S57Δ ou de réaliser un knock-down de FUS grâce à un morpholino (ARN antisens). Il a été montré que la perte de FUS diminue la réponse motrice observée suite à un contact. **Ce phénotype moteur, induit par la perte de FUS, est sauvé par la surexpression de FUS sauvage, mais pas par les autres gènes causant la SLA telles que TARDBP et SOD1.** Par ailleurs, les larves injectées avec Fus R521H sont également capables d'induire une diminution de la motricité. Etonnement, aucun déficit moteur n'est observé après une surexpression de Fus R521C ou S57Δ. Par conséquent, **le phénotype moteur peut provenir de la perte ou du gain de fonction.** La suite de l'étude a montré que la surexpression de FUS sauvage sauve le phénotype moteur induit par TARDBP ce qui suggère une **interaction entre FUS et TARDBP.** Enfin, le phénotype moteur induit par la perte ou le gain de fonction de SOD1 n'est restauré ni par FUS sauvage, ni par TARDBP sauvage. Il n'y a donc **pas d'interaction génétique entre SOD1 et FUS/TARDBP.** SOD1 agit de façon indépendante des deux protéines de liaison à l'ARN FUS et TARDBP.

Toutefois, toutes ces protéines ont la capacité de s'agréger dans le cytoplasme des patients. Il est connu que cette agrégation entraîne des altérations du métabolisme de l'ARN. Robinson et collaborateurs en 2015 ont tenté de répondre à la question : comment l'interaction de FUS avec les ARN dans le cytoplasme entraîne l'agrégation ? (Robinson et al 2015). Pour cela, un modèle murin dépourvu de domaine RRM a été généré en supprimant les acides aminés 300-360 et la mutation R522L a été insérée sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1. Cette mutation entraîne un phénotype sévère associé à une létalité précoce dès 20 jours ainsi qu'une perte de poids à hauteur de 30% et des tremblements. L'avantage de ce modèle est que dans un même

organisme, il y a une accumulation de FUS dans le cytoplasme et une perte partielle de FUS nucléaire des neurones corticaux et du tronc cérébral. De plus, l'absence de RRM entraîne la formation de larges inclusions cytoplasmiques de FUS. Les **propriétés d'agrégation sont donc médiées en grande partie par le motif de reconnaissance de l'ARN**. Il y a cependant une limite majeure dans ce modèle : aucune perte neuronale ni aucune neuroinflammation n'a été observée. De plus, le phénotype moteur n'a pas été caractérisé et la modification génétique est exclusivement neuronale. Dans cette maladie multicellulaire, l'implication des cellules non neuronales est donc négligée.

En 2016, le modèle de Scekcic-Zahirovic et collaborateurs a permis d'étudier la conséquence du gain et de la perte de fonction de *Fus* dans l'organisme entier de souris Knock-in. Une ablation de l'exon 15 codant pour la NLS est effectuée en insérant, entre les exons 12 et 13, une séquence floxée codant pour l'exon 13, l'exon 14 et suivi de trois cassettes STOP. Ces souris sont donc constitutivement porteuses d'une mutation Δ NLS, qui peut être sauvée par recombinaison via la CRE recombinase qui restaure l'expression de la NLS. Dans ce modèle, la **perte complète de FUS dans le noyau associée à son accumulation dans le cytoplasme entraîne une létalité périnatale**. Les souris décèdent quelques minutes après la naissance, présentent une **diminution du poids et de la taille** ainsi qu'une **insuffisance respiratoire**. Les NM sont également atteints et dégénèrent, les **partenaires de FUS spécifiques aux NM sont délocalisés** (SMN et HDAC1) et **l'expression génique est altérée**. Pour déterminer si la neurodégénérescence est due à la toxicité neuronale de FUS, un croisement est réalisé entre les souris $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ et des souris possédant de la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur ChAT spécifique des neurones cholinergiques. Il a alors été montré que **la localisation nucléaire de FUS spécifiquement dans les neurones cholinergiques prévient la perte des NM (Scekcic-Zahirovic et al 2016)**. En 2017, la description du modèle a été poursuivie en étudiant le phénotype des souris hétérozygotes (Scekcic-Zahirovic et al 2017). Ici, la délocalisation partielle de *Fus* dans le cytoplasme entraîne une dégénérescence des neurones moteurs associée à un **phénotype moteur**. À 10 mois, les performances motrices des souris hétérozygotes sont réduites lors du test de la grille inversée et du catwalk. De façon complémentaire, l'EMG a montré une dénervation à 22 mois dans les muscles tibialis et gastrocnémien chez les

hétérozygotes. **La restauration de l'expression de la forme normale du gène FUS dans les neurones prévient la dégénérescence des NM et retarde l'apparition du déficit moteur.** En effet, à 10 mois, les performances motrices sont comparables entre les souris sauvage et h/Chat-CRE. Cependant, les défauts myéliniques observés par séquençage de l'ARN ne sont pas compensés par cette restauration de FUS dans les neurones. Cela suggère que **la délocalisation de Fus dans le cytoplasme conduit à une altération de la physiologie des oligodendrocytes indépendamment de la toxicité de FUS dans les NM (Scekic-Zahirovic et al 2017).** Des résultats très similaires ont été obtenus par Devoy et collaborateurs qui ont observé une perte tardive de motoneurones et un phénotype neuromusculaire quasi identique dans leurs souris *Fus* Δ 14 knock-in (Devoy et al 2017). Au-delà de *Fus*, un knock-in de *Tardbp* présente aussi des phénotypes très proches de ceux observés par Scekic-Zahirovic (Fratta 2018 sous presse à EMBO, Rouaux 2018 sous presse à EMBO).

Enfin, chez le patient, une méthylation de FUS est observée dans les inclusions Fus positive (Dormann et al 2012). De façon très analogue, une telle augmentation de la **méthylation asymétrique de FUS a été observé dans le noyau et le cytoplasme de la moelle épinière** des souris *Fus* ^{Δ NLS/+}. Ce modèle récapitule donc les traits caractéristiques de la SLA et son caractère conditionnel lui confère l'avantage d'étudier spécifiquement la toxicité induite par la mutation FUS dans un type cellulaire spécifique. Au cours de ma thèse, nous avons exploité cette capacité pour analyser l'implication du muscle dans la SLA liée à *FUS*.

Etude	Espèce	Gain ou perte de fonction	Type de modèle	Phénotype
Sun et al 2011	Levure	Gain de fonction	Expression de FUS avec une mutation RRM ou avec différentes tronctions	Agrégats fus, granule de stress
Fushimi et al 2011	Levure	Gain de fonction	Expression de R524S, P525L	Agrégats Fus
Murakami et al 2015 (a)	C.elegans	Gain de fonction	Mutation neuronale: R514G, R521G, R522G, R524S, P525L	Accumulation de fus dans le cytoplasme, diminution de la survie, déficit moteur, dysfonctions neuronale, pas d'agrégat FUS
Murakami et al 2015 (b)	C.elegans	Gain de fonction	Mutation neuronale: R514G, R521G, R522G, R524S, P525L	Toxicité neuronale, altération de la formation d'hydrogel, altération de la formation de granule d'ARN
Vaccaro et al 2012	C.elegans	Gain de fonction	Expression de Fus WT ou muté (S57Δ)	Neurodégénérescence, paralysie, fus mutant est insoluble, survie inchangée, dysfonction neuronale, altération de la transmission synaptique
Wang et al 2011	Drosophile	Perte de Fonction	Délétion du gène caz (FUS)	Problèmes d'éclosion, déficit moteur, baisse de la survie
Lanson et al 2011	Drosophile	Gain de fonction	Expression de Fus R521C, R521H humain	Perte des MN, pas d'altération de la JNM, baisse de la survie
Shahidullah et al 2013	Drosophile	Gain de fonction	Expression de R521C humain dans les neurones moteurs	Altération de la transmission synaptique
Miguel et al 2012	Drosophile	Gain de fonction	Expression de Fus WT humain	Fus insoluble dans les neurones adultes, diminution de la survie
Chen et al 2011	Drosophile	Gain de fonction	Expression de Fus R524S et P525L humain	Perte des MN, défaut axonal, augmentation de la taille et de l'aire des MN, défaut moteurs
Xia et al 2012	Drosophile	Gain de fonction	Espression of Fus WT, R521G, Δ32, Caz	Déficit moteur, altération de la JNM, neurodégénération
Frickenhaus et al 2015	Drosophile	Perte de Fonction	Selective inactivation of Caz in neurons or muscle	Inactivation de caz dans les neurones: baisse de la survie, déficit moteurs. Inactivation de Caz dans le muscle: altération du muscle dans largeur mais pas dans sa longueur
Dichmann et Harland 2012	Xénope	Perte de Fonction	Antisens Morpholino	Défaut d'épissage
Bosco et al 2010	Poisson zèbre	Gain de fonction	Injection d'ARN : FUS WT, H517Q, R521C, R495X, G515X	Fus cytoplasmique, granule de stress
Kabashi et al 2011	Poisson zèbre	Perte/Gain de fonction	Antisens Morpholino (R521C, R521H)	Problèmes comportementaux, défaut axonal
Armstrong et drapeau 2013	Poisson zèbre	Perte/Gain de fonction	Antisens Morpholino (R521C, R521H)	Altération de l'activité motrice, diminution de la transmission synaptique
Huang et al 2011	Rat	Gain de fonction	Mutation R521C	Mortalité précoce
Huang et al 2012	Rat	Gain de fonction	Mutation inductible R521C	Paralysie antérieure et postérieure, perte des neurones dans le cortex et l'hippocampe, altération des dendrites des neurones dans le cortex
Shelkownikova et al, 2013	Souris	Gain de fonction	Fus humain sans NLS	Déficit moteur dès 3 mois, perte des MN dans la ME, neuroinflammation, atrophie, inclusion FUS
Verbeeck et al 2012	Souris	Gain de fonction	Injection AAV de Fus R521C, ΔR14, FUS WT	Pas de déficit moteur, accumulation de Fus dans le cytoplasme
Mitchell et al 2013	Souris	Gain de fonction	Surexpression de Fus WT humain	Mort à 1 mois, paralysie des membres postérieurs, accumulation cytoplasmique de Fus, pas de perte des MN
Qiu et al 2014	Souris	Gain de fonction	Mutation R521C	Atrophie, paraplégie, mort à 6 semaines, perte des MN dans la ME, neuroinflammation, défaut synaptique
Sephton et al 2014	Souris	Gain de fonction	Cre loxP avec mutation R521G	Déficit moteur, pas d'agrégats Fus, pas de perte des MN, dénervation, atrophie, neuroinflammation,
Sharma et al 2016	Souris	Gain de fonction	Cre loxP avec surexpression de Fus WT humain	Faiblesse musculaire postérieure, altération de la JNM, activation des astrocytes et microglies
Kuroda et al 2000	Souris	Perte de Fonction	Fus -/-	Stérilité chez le mâle
Hicks et al 2000	Souris	Perte de Fonction	Fus -/-	Déficit Lymphocyte B, mort 16h après la naissance
Kino et al 2015	Souris	Perte de Fonction	Fus -/-	Hyper activité, réduction de l'anxiété, perte de poids, pas de problème moteur
Robinson et al, 2015	Souris	Perte/Gain de fonction	Mutation R522G et absence de RRM	Perte de poids, tremblement, inclusion FUS (cortex et tronc cérébral), pas de perte des MN
Scckic-Zahirovic et al 2016	Souris	Perte/Gain de fonction	Cre loxP avec délétion de la NLS	Souris homozygotes : mort en post natal, perte des MN, insuffisance respiratoire, diminution de la taille et du poids, Fus uniquement cytoplasmique
Scckic-Zahirovic et al 2017	Souris	Perte/Gain de fonction	Cre loxP avec délétion de la NLS	Sauvetage de Fus dans les MN des souris homozygotes : MN normaux, mort en post natal
				Souris hétérozygotes : apoptose des MN, déficit moteur
				Sauvetage de Fus dans les MN des souris hétérozygotes : MN normaux, déficit moteur

Figure 26 : Modèles animaux de SLA liés à la mutation FUS

Objectifs et Problématique de la thèse

Objectifs et problématique de la thèse

Dans le chapitre précédent, nous avons pu voir que la SLA est une maladie neurodégénérative pouvant se présenter sous une forme bulbaire, spinale ou respiratoire et aboutissant à une paralysie progressive et finalement à la mort du patient. Certaines formes de SLA sont familiales et sont liées à des mutations dans différents gènes, tels que *SOD1*, *TARDBP*, *C9ORF72* et *FUS*. Les nombreuses avancées dans l'architecture génétique de la SLA ont permis de repenser les mécanismes pathologiques mis en œuvre. Trois grands mécanismes ont émergé grâce à ces nouvelles données : l'altération du métabolisme de l'ARN, de l'homéostasie protéique et du remodelage du cytosquelette. Ces trois mécanismes pourraient converger *via* les mécanismes de séparation en phase liquide-liquide, récemment découverts, qui pourraient sous-tendre l'apparition d'agrégats pathologiques et ainsi la dégénérescence des NM. Par ailleurs, il est aujourd'hui admis que plusieurs types cellulaires sont impliqués dans le développement de la SLA en entraînant la mort des NM. C'est notamment le cas pour les microglies et les astrocytes. De façon très étonnante, bien que de nombreuses altérations aient été mises en évidence dans le muscle squelettique, sa contribution au sein de la pathologie reste controversée. L'étude de Miller et collaborateurs en 2006 suggère un rôle passif du muscle (Miller et al 2006). En effet, la suppression sélective de la mutation de *SOD1* spécifiquement dans le muscle ne semble pas affecter la survie des souris ou la dégénérescence de NM. Cependant, la faible réduction induite par l'expression du transgène (25%) rend ces conclusions faibles. À l'inverse, plusieurs études suggèrent un rôle actif du muscle. Dobrowolny et collaborateurs en 2008 ont réalisé une expression sélective de *SOD1*^{G93A} dans le muscle et ont montré une augmentation du métabolisme oxydatif et l'apparition d'une atrophie musculaire. Wong et Martin en 2010, ont montré que la surexpression de la mutation G37R de *SOD1* dans le muscle cause une faiblesse musculaire et une fonction motrice anormale, une myopathie ainsi qu'une dégénérescence des NM. Cependant, ces études ne sont pas entièrement concordantes, car Dobrowolny et collaborateurs n'ont observé aucune perte de NM. De plus, l'utilisation de promoteurs forts (promoteur sur lequel se fixent un grand nombre de facteurs de transcriptions) pour surexprimer une protéine intrinsèquement toxique pourrait entraîner des artéfacts de transgénèse.

L'objectif de ma thèse est donc d'étudier la contribution musculaire dans un modèle murin de SLA liée à la mutation de FUS. Pour étudier cette question, nous avons utilisé le modèle murin *Fus* Δ NLS, car il présente deux avantages techniques importants : il s'agit d'un modèle « knock-in », où la mutation est portée par le gène murin endogène. De plus, ce modèle est conditionnel *via* la possibilité de recombinaison dépendante de la CRE. Nous avons émis l'hypothèse que la délocalisation induite par la mutation dans la NLS de FUS pourrait être toxique dans le muscle. En effet, les études préliminaires du laboratoire ont montré que le rétablissement (c'est-à-dire sa relocalisation nucléaire) de FUS spécifiquement dans les NM grâce au promoteur *ChAT*, ne permet d'améliorer ni la survie, ni la taille ni même le poids des souris homozygotes Δ NLS et ne compense pas le déficit moteur observé chez les souris hétérozygotes Δ NLS. Ces résultats suggèrent que la délocalisation de FUS dans le cytoplasme est toxique dans un autre tissu. Afin de montrer que le muscle contribue activement dans la SLA liée à une mutation de *FUS*, mon travail de thèse s'est décliné en deux parties.

Dans un premier temps, j'ai caractérisé le **rôle de FUS au sein de la jonction neuromusculaire**. Grâce à des immunomarquages, j'ai mis en évidence la localisation de FUS sauvage et muté au sein de la JNM et j'ai caractérisé l'état des JNM à différents stades de la maladie. J'ai également élucidé une partie du mécanisme d'action de FUS pour stimuler la formation de la JNM par différentes techniques de culture cellulaire, de transfections et de gènes rapporteurs. Enfin, j'ai développé la technique d'immunoprécipitation de la chromatine afin d'identifier si FUS se lie aux gènes clés du développement de la JNM. Dans un deuxième temps, j'ai étudié le **rôle de FUS dans le muscle squelettique**. Pour cela, j'ai analysé les résultats d'un séquençage à haut débit du transcriptome musculaire, étudié la fonction mitochondriale, et analysé comment FUS pouvait altérer le transcriptome musculaire pour expliquer les phénotypes observés.

Ces deux axes de recherches font l'objet de mes deux papiers de thèse, détaillés dans la partie résultats, et s'intègrent dans un vaste réseau de collaborations pour comprendre les fonctions de FUS dans le muscle squelettique. Ils mettent, pour la première fois, en évidence un rôle de FUS au sein du muscle et de la JNM ainsi que la contribution de la forme musculaire de FUS muté dans le mécanisme pathologique de la SLA.

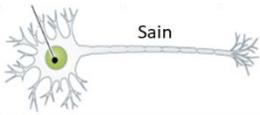
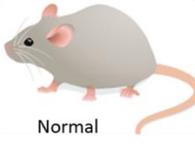
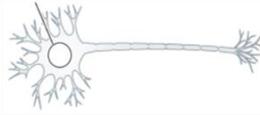
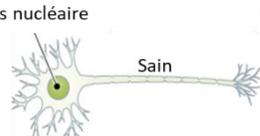
	Localisation cellulaire de FUS		Phénotype	
	Neurones Moteurs	Autres cellules	Homozygote	Hétérozygote
FUS Normal	FUS +/+ Fus nucléaire  Sain	Fus nucléaire 	 Normal	 Normal
Perte de FUS	FUS -/- Pas de Fus 	Pas de Fus 	 Mort en post natal Diminution de la taille et du poids Insuffisance respiratoire NM normaux	
Délocalisation de FUS	FUS ΔNLS Fus cytoplasmique  Dégénérescence	Fus cytoplasmique 	 Mort en post natal Diminution de la taille et du poids Insuffisance respiratoire Dégénérescence des NM	 Déficit moteur Apoptose des NM
Sauvetage de FUS dans les NM	FUS NLS ChaT CRE Fus nucléaire  Sain	Fus cytoplasmique 	 Mort en post natal Diminution de la taille et du poids NM Normaux	 Déficit moteur NM normaux

Figure 27 : Les phénotypes des différents modèles SLA-FUS utilisés au laboratoire suggèrent une toxicité du mutant FUS dans un autre tissu.

En condition physiologique, FUS est ubiquitaire et nucléaire. Dans notre modèle FUS knock-out, la perte totale de FUS induit la mort des souris à la naissance, une diminution de la taille et du poids ainsi qu'une insuffisance respiratoire. Le gain de fonction toxique du modèle *Fus* ΔNLS apporte la dégénérescence des NM chez les souris homozygotes. Les souris hétérozygotes ΔNLS, quant à elles, présentent une dégénérescence des NM associée à un déficit moteur. Le croisement entre des souris *Fus* ΔNLS et des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur ChAT, restaure une expression normale de FUS dans les NM. Malgré des NM normaux, les souris homozygotes meurent à la naissance et sont plus petites. De plus, le déficit moteur persiste chez les souris hétérozygotes. Ceci suggère que la mutation de FUS est toxique dans un autre tissu. Modifié d'après (Dorman, 2016).

Résultats

Résultats

I. Publication 1 : Rôle de FUS au sein de la jonction neuromusculaire (soumis)

Les études menées au laboratoire ont montré, dans un modèle murin *Sod1*, que la JNM est la première structure à être affectée dans la SLA et que des défauts musculaires sont présents à un stade précoce de la pathologie. De plus, les études de Scekic-Zahirovic et collaborateurs en 2016 et 2017 ont montré que la partie pré-synaptique est atteinte dans le modèle murin *Fus* Δ NLS. Cependant, la partie post-synaptique n'a pas été caractérisée. Nous avons ici émis l'hypothèse que la JNM est détériorée chez ces souris et nous avons étudié le rôle de FUS dans la JNM.

Pour cela, j'ai tout d'abord analysé la morphologie de la JNM dans le muscle squelettique de souris homozygotes FUS. J'ai ensuite observé une diminution du nombre et de la taille des JNM dans différents muscles de souris *Fus* Δ NLS et knock-out. Afin de savoir si cette toxicité est due à FUS musculaire ou neuronale, des croisements entre des souris FUS Δ NLS et des souris exprimant de la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur musculaire MyoD ont été effectués par Erik Strokebaum. Nous avons montré que chez les souris MyoD^{iCre/+} – *Fus* ^{Δ NLS/ Δ NLS}, la taille des JNM est augmentée comparé aux souris MyoD^{+/+} – *Fus* ^{Δ NLS/ Δ NLS}. Ces résultats suggèrent une toxicité de *Fus* intrinsèque au muscle.

Par la suite, j'ai étudié la JNM dans le muscle gastrocnémien et tibialis de souris hétérozygotes FUS Δ NLS à un stade précoce et avancé de la maladie. J'ai à nouveau identifié une diminution de la taille des JNM (comme chez les homozygotes à la naissance) mais associée cette fois-ci, à une dénervation chronique progressive avec l'âge.

Afin de comprendre comment FUS agit sur la JNM, j'ai réalisé des immunomarquages de FUS et de la JNM qui ont montré que FUS est présente dans les noyaux sous-synaptiques et cet enrichissement est diminué en présence de la mutation. De plus, la localisation sous-synaptique de FUS est dépendante de l'innervation.

Mes résultats suggèrent que FUS serait impliquée dans la régulation de l'expression des AchR nicotiques. Dans un modèle cellulaire, le knock-down de *Fus* est suffisant et nécessaire à l'expression des gènes impliqués dans la formation de la JNM. Par ailleurs, la mutation de *FUS*

possède un effet dominant négatif sur FUS WT qui prévient l'expression des gènes de la JNM. Enfin, grâce à des immunoprécipitations de la chromatine, nous avons montré que FUS se lie aux promoteurs des gènes codant les AchR.

De façon très intéressante, j'ai mis en relation FUS avec ERM, un facteur de transcription sous-synaptique. En effet, l'effet de FUS sur l'activité de la sous-unité ϵ du récepteur à l'Ach (chnre) est bloquée par le knock-down d'ERM et à l'inverse, l'effet d'ERM sur les chnre est inhibée par le knock-down de FUS. Des immunoprécipitations de FUS et ERM (réalisées en collaboration avec Chantal Sellier), ont également montré une interaction entre ces deux protéines.

Enfin, l'étude de cellules IPS dérivées en myotubes de patients *FUS*-ALS a confirmé les résultats issus de nos modèles (collaboration avec Tobias Boeckers). Un défaut de maturation de la JNM a été observé dans les myotubes *FUS*-ALS. De plus, les co-cultures de mutants FUS musculaires ou neuronaux ont montré une toxicité intrinsèque au NM et aux myotubes.

Ces résultats montrent que FUS joue un rôle clé dans la JNM et sa mutation dans le muscle est toxique.

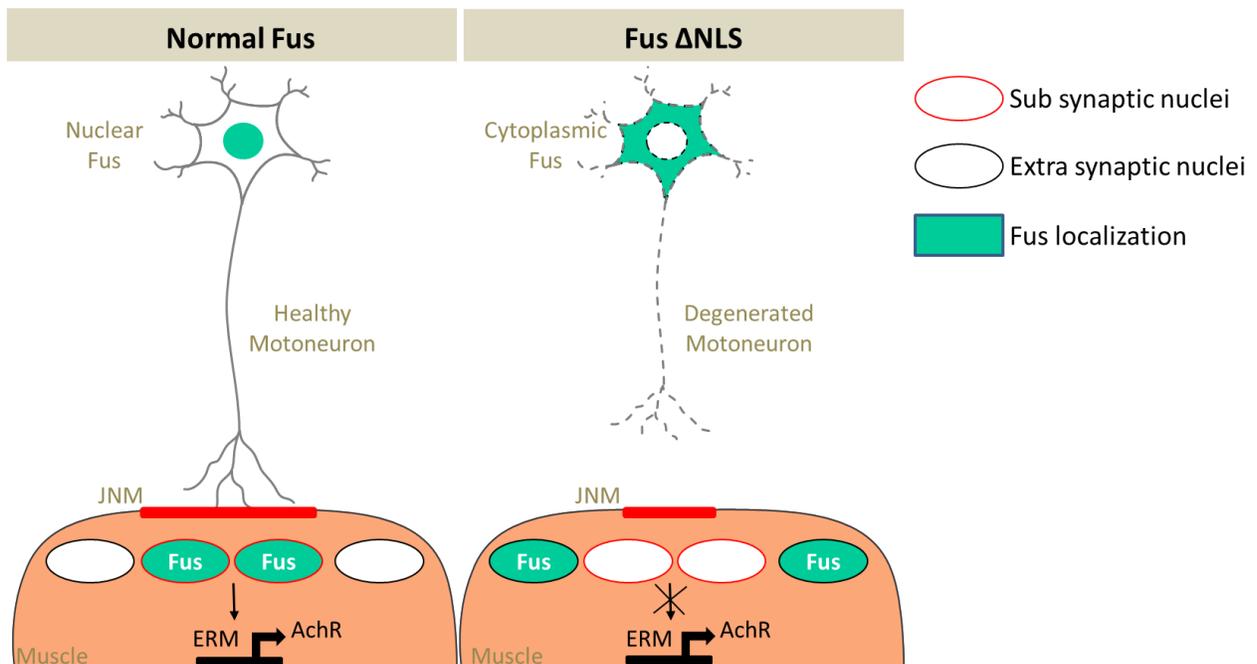


Figure 28 : Rôle de FUS au sein de la jonction neuromusculaire

La SLA-FUS entraîne une dégénérescence des NM associée à une dénervation au niveau de la JNM. Dans la partie post-synaptique, FUS est délocalisé dans les noyaux extra-synaptiques, ce qui empêche son interaction avec ERM. La transcription des AchR sera alors inhibée entraînant ainsi une diminution de la taille de la JNM.

FUS-mediated transcriptional regulation of acetylcholine receptor expression at the neuromuscular junction is compromised in amyotrophic lateral sclerosis

Gina Picchiarelli^{1,*}, Maria Demestre^{2,*}, Sina Mersmann^{3,4}, Moushami Mallik^{3,4,5}, Julia Higelin², Stéphane Dieterlé¹, Marc-Antoine Goy¹, Li Zhang^{3,4}, Chantal Sellier⁶, Jelena Scekcic-Zahirovic¹, Marina Wagner^{3,4}, Imma Sanjuan-Ruiz¹, Nadia Messadeq⁶, Nick van Bakel⁵, Anne-Laurence Boutillier⁷, Albert Ludolph², Clotilde Lagier-Tourenne^{8,9}, Tobias Boeckers^{2,10}, Luc Dupuis^{1,10}, Erik Storkebaum^{3,4,5,10}

¹ Université de Strasbourg, Inserm, UMR-S1118, F-67085, Strasbourg, France

² Institute of Molecular and Cellular Anatomy, Ulm, Germany

³ Molecular Neurogenetics Laboratory, Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Muenster, Germany

⁴ Faculty of Medicine, University of Muenster, Muenster, Germany

⁵ Department of Molecular Neurobiology, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands

⁶ IGBMC, INSERM U964, CNRS UMR7104, University of Strasbourg, 67404, Illkirch, France.

⁷ Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7364, F-67000 Strasbourg, France

⁸ Department of Neurology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Charlestown, MA 02129, USA

⁹ Broad Institute of Harvard University and MIT, Cambridge, MA 02142, USA

*these authors contributed equally

¹⁰corresponding authors:

Erik Storkebaum: e.storkebaum@donders.ru.nl

Phone: +31 6 25 76 60 73

Luc Dupuis: ldupuis@unistra.fr

Phone: +33 3 68 85 34 57

Tobias Boeckers: tobias.boeckers@uni-ulm.de

Phone: +49 731-500-23221/0

Abstract

In innervated muscle fibers, acetylcholine receptor (AChR) subunit genes are selectively expressed in subsynaptic nuclei. This phenomenon is mediated by binding of neural agrin to its postsynaptic receptor Lrp4, leading to activation of MuSK and the Ets transcription factor Erm. Neuromuscular junction (NMJ) pathology is considered an early event in the pathogenesis of the motor neurodegenerative disorder amyotrophic lateral sclerosis (ALS), yet there is currently no direct link between NMJ establishment pathways and ALS-causing gene mutations. The most severe forms of ALS are associated with heterozygous mutations in *FUS*, encoding a DNA/RNA-binding protein involved in gene expression regulation. Here, we report NMJ morphology defects in a knock-in *Fus*-ALS mouse model. Newborn homozygous *Fus* mutant mice displayed predominantly post synaptic NMJ defects that could be attributed to intrinsic toxicity of mutant FUS in muscle. Adult heterozygous *Fus* mutant mice displayed smaller neuromuscular endplates, that denervate long before motor neuron cell body loss, consistent with a 'dying-back' mechanism of motor neurodegeneration. Importantly, FUS was enriched in subsynaptic nuclei and this enrichment depended on innervation and was perturbed in heterozygous *Fus* mutant mice. Mechanistically, FUS bound to the promoter region of AChR subunit genes and stimulated their transcription. Moreover, we provide evidence that FUS physically interacts with Erm, is required for Erm-dependent induction of AChR expression, and *vice versa*, Erm is required for FUS to stimulate AChR expression. In iPSC-derived myotube cultures and motor neuron/myotube co-cultures from *FUS*-ALS patients, endplate maturation was impaired and AChR expression reduced, underscoring the potential relevance of our findings for human *FUS*-ALS. Finally, in motor neuron/myotube co-cultures, ALSmutant FUS was intrinsically toxic to both motor neurons and myotubes. Together, our findings reveal a key role for FUS in regulating selective expression of AChR genes in subsynaptic nuclei and indicate that intrinsic toxicity of ALS-mutant FUS in muscle may contribute to dying-back motor neuronopathy in *FUS*-ALS.

Introduction

The neuromuscular junction (NMJ) is the chemical synapse between motor neurons and skeletal muscles fibers. In mammals, neuromuscular transmission is mediated by release of acetylcholine (ACh) from presynaptic terminals, which binds and activates the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor (AChR), a ligand-gated ion channel. During development, even before innervation, AChR clusters are already present in the center of the muscle – the region of future innervation – in a nerve-independent process called prepatternning^{1, 2}. Muscle innervation by motor neurons induces AChR aggregation in postjunctional membranes and dispersion of nonsynaptic AChR clusters. Interestingly, upon innervation, transcription of AChR subunit genes and other synapse-specific genes becomes confined to myonuclei underlying the neuromuscular contact, referred to as ‘fundamental’ or ‘subs synaptic’ nuclei^{2, 3}. On the one hand, this process involves suppression of synapse-specific genes in nonsynaptic nuclei by nerve-evoked muscle activity. On the other hand, synapse-specific gene expression is stimulated in subsynaptic nuclei by agrin secreted from motor nerve terminals. Agrin binding to its postsynaptic receptor Lrp4 (lipoprotein receptor-related protein 4) leads to activation of MuSK (muscle-specific kinase) and the downstream Rac/MKK7/JNK pathway^{2, 3}. This results in phosphorylation and activation of the Ets transcription factor Erm, which binds to N-box elements in the promoters of synapse-specific genes, including those encoding AChR subunits, utrophin and acetylcholinesterase⁴, and is associated with chromatin remodeling in these subsynaptic nuclei⁵.

Proper NMJ function is essential for posture, movement and respiration, and structural and functional NMJ defects have been implicated in a plethora of diseases², including the motor neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis (ALS)⁶. ALS is considered a ‘dying-back’ motor neuronopathy, as at least in mutant SOD1 mouse models and a sporadic ALS patient, denervation of neuromuscular endplates is an early pathological event that precedes axonal degeneration and loss of motor neuron cell bodies⁷⁻⁹. The most severe forms of ALS, with early onset and rapid disease progression, are caused by heterozygous mutations in *FUS*, which encodes a DNA/RNA binding

protein that is involved in several steps of gene expression regulation, including regulation of transcription, chromatin remodeling, mRNA splicing and mRNA subcellular localization¹⁰. FUS is one of the protagonists of a group of RNA-binding proteins that have all been linked to ALS, including TDP-43, TAF15, EWSR1, hnRNPA2B1, hnRNPA1 and matrin-3, thus implicating defects in RNA biogenesis in ALS pathogenesis^{6, 11}. Beyond ALS, cytoplasmic inclusions containing FUS or TDP-43 are pathological hallmarks in respectively ~10% and ~45% of patients with frontotemporal dementia, the most common form of dementia before the age of 60¹¹. The vast majority of ALS-causing *FUS* mutations cluster in the extreme C-terminus of FUS, either missense mutations in the nuclear localization signal (NLS) or frameshift or nonsense (truncating) mutations in or before the NLS¹². These mutations result in cytoplasmic mislocalization of FUS and concomitant reduction of nuclear FUS levels, and this subcellular mislocalization is likely an important event in ALS pathogenesis^{11, 13}.

We have previously generated a knock-in *Fus*-ALS mouse model, which expresses a truncated FUS protein that lacks the last 20 amino acids which include the NLS (*Fus*^{ΔNLS} mice)¹⁴. This results in cytoplasmic mislocalization of FUS, with concomitant reduction of nuclear FUS levels. In order to discriminate between phenotypes induced by loss of nuclear FUS function versus toxicity induced by cytoplasmic mislocalization of the mutant FUS protein, we also generated *Fus* knockout mice (*Fus*^{-/-} mice)¹⁴. Overall, homozygous *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and *Fus*^{-/-} mice displayed similar phenotypes, most prominently perinatal lethality due to respiratory insufficiency, likely attributable to loss of nuclear FUS function. However, loss of ~30% of motor neuron cell bodies was found in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} but not *Fus*^{-/-} mice, suggesting a gain-of-toxic-function mechanism¹⁴. Heterozygous *Fus*^{ΔNLS/+} mice provide a mouse model for *FUS*-ALS, as they recapitulate several pathological hallmarks of ALS and they display adult-onset progressive motor neurodegeneration associated with motor deficits¹⁵.

Here, we investigated the possible contribution of NMJ defects to *FUS*-ALS. In *Fus* mutant mouse models, we identified predominantly post synaptic defects: the endplate surface area and the total number of endplates in hind limb muscles was significantly

reduced in newborn *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} mice. Also in adult *Fus*^{ΔNLS/+} mice, endplate surface area was reduced and progressive endplate denervation preceding motor neuron loss was found. Selective reversal of the *Fus*^{ΔNLS} allele to wild type in skeletal muscle revealed that post synaptic defects in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} mice are attributable to intrinsic toxicity of the cytoplasmically mislocalized FUS protein in muscle. Furthermore, we found that FUS is enriched in subsynaptic nuclei and FUS stimulates transcription of AChR subunit genes through Erm. These findings may be relevant for human *FUSALS*, as studies in iPSC-derived myotubes and motor neurons of *FUS*-ALS patients further demonstrated an intrinsic toxicity of ALS-mutant FUS in both motor neurons and myotubes. Together, our data indicate that FUS regulates the synapse-specific expression of AChR subunit genes, that NMJ pathology is likely an early event in *FUSALS*, and that ALS-mutant FUS is not only toxic to motor neurons but also to muscle fibers, what likely contributes to NMJ pathology.

Results

Neuromuscular junction morphology defects in newborn *Fus* mutant mice

Complete loss of the FUS protein in *Fus*^{-/-} mice, as well as its mislocalization in the cytoplasm in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} mice, leads to death at birth¹⁴. Since possible defects in NMJs could underlie premature death of both mouse models, we evaluated NMJ morphology in newborn *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and *Fus*^{-/-} mice. Thick (100 μm) longitudinal sections through the tibialis anterior muscle were stained for neurofilament to visualize motor axons and SV2 to visualize synaptic vesicles in nerve terminals. Fluorescently labeled bungarotoxin was used to simultaneously visualize AChR clusters in muscle endplates (**Figure 1a, b**). As endplate morphology and size is rather heterogeneous, even in wild type pups, we analyzed ~100 to 150 NMJs per muscle, in order to obtain representative average values. Surprisingly, in the tibialis anterior, endplate innervation - evaluated by scoring whether endplates are apposed by a presynaptic nerve terminal - was not different between *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and wild type littermate controls, with almost all endplates innervated (**Figure 1a, c**). However, the endplate surface area was significantly reduced in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} muscles, by ~27% as compared to control (**Figure 1d**). We further quantified the total number of endplates in the tibialis anterior by counting all endplates in the different focal planes of each section (see methods for details). Remarkably, the total number of endplates was significantly reduced (~19%) in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} muscles (**Figure 1e**). In *Fus*^{-/-} muscles, endplates were normally innervated (**Figure 1b, f**), and the endplate area was not altered (**Figure 1g**). However, similar to *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} mice, the total number of endplates in the tibialis anterior was reduced by ~25% (**Figure 1h**). To evaluate whether the findings in the tibialis anterior can be generalized to other muscles, we performed a similar analysis in the gastrocnemius and obtained similar results: the innervation status was not changed in either *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} or *Fus*^{-/-}, the endplate area was significantly reduced in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} (~17%), but not *Fus*^{-/-}, and the total number of endplates was significantly reduced in both *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} (~33%) and *Fus*^{-/-} (~30%) (**Supplementary Figure 1**). Together, these findings point towards a postsynaptic defect

in NMJs of FUS mutant mice, with a reduced endplate number (both models) and size (only *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS}).

Consistently, ultrastructural (TEM) analysis of E18.5 gastrocnemius confirmed a post synaptic defect, as the vast majority of *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} postjunctional membranes were not apposed to the nerve terminal and the characteristic invaginations of the postsynaptic muscle membrane (postjunctional folds) were missing. In contrast, in wild type littermate controls, muscle membranes were properly apposed to neuronal membranes, with characteristic junctional folds (**Figure 1i**). In addition, presynaptic defects were found in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} muscle, as the continuity of the neuronal membrane was frequently disrupted, and presynaptic terminals often lacked visible synaptic vesicles and mitochondria, indicative of presynaptic degeneration (**Figure 1i**). In *Fus*^{-/-} muscles, we observed a significant yet milder post synaptic defect, with NMJs occasionally lacking postjunctional folds, yet presynaptic and post synaptic membranes were properly apposed, and synaptic vesicles and mitochondria were normally present (**Figure 1j**). Thus, *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} NMJs display both presynaptic and post synaptic defects, whereas *Fus*^{-/-} NMJs show no signs of presynaptic degeneration, a normal endplate size, subtle ultrastructural signs of a postsynaptic differentiation defect and a significant reduction of the total number of endplates per muscle.

To exclude the possibility that the reduced number of endplates in FUS mutant muscles is simply due to a reduced number of muscle fibers, we quantified the total number of muscle fibers in the extensor digitorum longus (EDL) muscle of mutant FUS and control newborn pups. The EDL was chosen for this analysis, as this muscle is smaller than the tibialis anterior or the gastrocnemius, with a lower number of muscle fibers. Furthermore, in contrast to the feather-like anatomy of the tibialis anterior and gastrocnemius, all fibers of the EDL muscle run straight from tendon to tendon, so that a cross section through the middle part of the muscle allows for straightforward quantification of the total number of muscle fibers. Muscle fiber membranes were visualized by dystrophin staining (**Figure 1k**), and quantification revealed no significant differences in the total number of muscle fibers in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} versus control (**Figure 1l**).

Cytoplasmic mislocalized Fus^{ΔNLS} protein is intrinsically toxic to muscle

As morphological analysis of NMJs in newborn *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and *Fus*^{-/-} mice revealed predominantly post synaptic defects, we decided to evaluate whether the FUS^{ΔNLS} protein is intrinsically toxic to muscle, by selectively reverting the *Fus*^{ΔNLS} allele to wild type in skeletal muscle. *MyoD*^{iCre} mice were selected for this purpose, as they selectively express iCre in committed myogenic progenitor cells from E10.5 onwards, resulting in excision of loxP-flanked genomic sequences in skeletal muscles^{16, 17}. To quantify the efficiency of excision of loxP-flanked sequences in skeletal muscles, *MyoD*^{iCre/+} mice were crossed to *ROSA*^{mT/mG} reporter mice¹⁸. The latter mice express membrane-targeted tandem dimer Tomato (mT) prior to Cre-mediated excision and membrane-targeted EGFP (mG) after excision (**Supplementary Figure 2a**). In contrast to *ROSA*^{mT/mG/+} (control) mice, in which all cells were mT labeled, ≥99.5% of muscle fibers in the tibialis anterior of adult *MyoD*^{iCre/+}; *ROSA*^{mT/mG/+} mice were mG labeled (**Supplementary Figure 2b, c**). Thus, *MyoD*^{iCre} mediates highly efficient recombination in skeletal muscle fibers.

We next crossed the *MyoD*^{iCre} mice to *Fus*^{ΔNLS} mice, with the purpose of selectively reverting the *Fus*^{ΔNLS} allele to wild type in skeletal muscle. Immunostaining revealed that in the tibialis anterior of newborn *MyoD*^{iCre/+}; *Fus*^{+/+} (control) mice, FUS was predominantly localized to the nucleus (**Figure 2a**). In contrast, in *MyoD*^{+/+}; *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} muscle, FUS displayed a diffuse cytoplasmic localization and was no longer enriched in nuclei (**Figure 2a**). Consistent with successful reversal of *Fus*^{ΔNLS}, FUS nuclear localization was restored in *MyoD*^{iCre/+}; *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} myofibers (**Figure 2a**). To assess whether the selective restoration of FUS subcellular localization in muscle fibers would rescue the NMJ morphology defects, we quantified the endplate surface area in the tibialis anterior of these mice. As expected, as compared to *MyoD*^{iCre/+}; *Fus*^{+/+} and wild type control mice, the endplate area was significantly reduced in *MyoD*^{+/+}; *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} mice (**Figure 2b**). Strikingly, in the tibialis anterior of *MyoD*^{iCre/+}; *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} mice, the endplate area was significantly rescued as compared to *MyoD*^{+/+}; *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS}, to a level that was not significantly different from control genotypes (**Figure 2b**). These data are consistent with cell-autonomous toxicity of the FUS^{ΔNLS} protein in skeletal muscle. Of note, in spite of

rescuing post synaptic defects, the presence of *MyoD*^{iCre} did not rescue the early postnatal lethality of *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} mice, indicating that FUS^{ΔNLS} toxicity in other cell types is sufficient to cause neonatal lethality.

Neuromuscular junction defects in adult heterozygous *Fus*^{ΔNLS/+} mice

Whereas homozygous *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and *Fus*^{-/-} mice die shortly after birth¹⁴, heterozygous *Fus*^{ΔNLS/+} mice develop adult-onset motor neurodegeneration after 10 months of age with associated defects in motor behavior, thus constituting a *FUS*-ALS mouse model¹⁵. We evaluated NMJ morphology in *Fus*^{ΔNLS/+} mice at 1 and 10 months of age. Motor axons and presynaptic terminals were visualized by immunostaining with antibodies against neurofilament and synaptophysin, and endplates were labeled by fluorescent bungarotoxin (**Figure 3a-b**). Already at 1 month of age, we observed significant denervation of NMJs in both tibialis anterior and gastrocnemius muscle, that worsened with age (**Figure 3c-d**). Importantly, the endplate surface area was significantly reduced at all ages and in both muscles, by ~20% as compared to wild type littermate controls (**Figure 3e-f**). Together, these data show chronic endplate denervation, progressing with age, accompanied with an early and sustained reduced size of endplates in *Fus*^{ΔNLS/+} mice, consistent with a 'dying-back' mechanism of motor neurodegeneration in this *FUS*-ALS mouse model.

FUS is enriched in subsynaptic nuclei dependent on innervation

Our findings that the endplate surface area is significantly reduced in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and *Fus*^{ΔNLS/+} mice through effects of the mutation in muscle cells suggested that FUS may regulate the expression of acetylcholine receptor (AChR) genes and possibly other genes encoding endplate components. It is well known that upon innervation, synapsespecific genes, including AChR subunit genes, become exclusively expressed in subsynaptic nuclei^{2, 3}. This prompted us to investigate the subcellular localization of FUS in adult gastrocnemius muscle, in relation to endplate localization. Intriguingly, we found that FUS was significantly enriched in subsynaptic nuclei (**Figure 4a**). Furthermore, in muscle

of 10 month-old *Fus* ^{Δ NLS/+} mice, FUS subsynaptic enrichment was substantially less pronounced (**Figure 4b**).

To investigate whether FUS enrichment in subsynaptic nuclei is dependent on innervation, unilateral axotomy of the sciatic nerve was performed in adult wild type mice, and FUS subsynaptic enrichment was evaluated in ipsilateral and contralateral gastrocnemius muscles. This experiment revealed that 5 days after injury, subsynaptic FUS enrichment was substantially attenuated in ipsilateral as compared to contralateral muscles (**Figure 4c, d**). Together, these data indicate that muscle innervation induces enrichment of FUS in subsynaptic nuclei, and that this process is disrupted in the presence of *Fus* ^{Δ NLS} protein.

FUS regulates expression of AChR subunit genes through Erm

It is tempting to speculate that the innervation-dependent FUS enrichment in subsynaptic nuclei is involved in regulation of the selective expression of genes encoding endplate components in these nuclei. To investigate this possibility, we turned to C2C12 mouse myoblast cells, a simplified cellular model standardly used in the NMJ field ^{19, 20}. C2C12 cells were treated with siRNA targeting FUS (*siFus*) or control siRNA (*siCt*) and differentiated for 2 days. *siFus* induced a strong knock-down of FUS expression, both at the transcript (**Figure 5a**) and the protein level (**Figure 5b**). Interestingly, FUS knock-down substantially reduced expression of each of the five AChR subunit genes, by >50% (**Figure 5c**). Consistently, also in muscles of E18.5 *Fus* ^{Δ NLS/ Δ NLS} mice, transcript levels of several AChR subunits were significantly reduced as compared to wild type littermate controls (**Supplementary Figure 3a**). Such a decrease in expression was also observed in the tibialis anterior muscle of 1 month old *Fus* ^{Δ NLS/+} mice (**Supplementary Figure 3b**)

To determine whether FUS might directly activate transcription of AChR encoding genes, we performed chromatin immunoprecipitation in C2C12 cells. Two different anti-FUS antibodies were able to robustly immunoprecipitate chromatin at the promoters of *Chrna1*, *Chrnd* and *Chrne* genes (encoding the AChR alpha1, delta and epsilon subunits, respectively), while there was no observable binding at the *H2ac* promoter. Importantly,

FUS binding at AchR gene promoters was similar to its binding at the *Mecp2* promoter, a known FUS target ²¹ (**Figure 5d**). To evaluate a direct promoter-dependent transcriptional mechanism, we transfected C2C12 cells with reporter constructs in which the *Chrnd* or *Chrne* promoters drive luciferase expression. FUS knock-down significantly reduced luciferase expression driven by either the *Chrnd* (**Figure 5e**) or the *Chrne* (**Figure 5f**) promoters ⁵, but not when luciferase expression was driven by the CMV promoter (**Figure 5g**). Conversely, overexpression of wild type human FUS strongly induced *Chrnd* and *Chrne* promoter activity (**Figure 5h**). Thus, FUS induces transcription of the *Chrnd* and *Chrne* genes by a promoter-dependent mechanism. Importantly, overexpression of FUS carrying the ALS-causing R495X mutation did not induce *Chrnd* or *Chrne* promoter activity (**Figure 5h**). This correlated with subcellular mislocalization of FUS_R495X, which was exclusively localized to the cytoplasm, in contrast to the predominant nuclear localization of wild type FUS (**Supplementary Figure 4**). In addition, when co-expressed with wild type FUS, FUS_R495X dose-dependently inhibited the induction of *Chrne* promoter activity by wild type FUS (**Figure 5i**), suggesting that FUS_R495X exerts a dominant negative effect on FUS-induced *Chrne* promoter activity. Treatment of C2C12 cells with agrin, a secreted factor known to stimulate synapse-specific gene expression ^{2, 3}, induced luciferase expression driven by the *Chrne* promoter (**Figure 5j**). Strikingly, knock-down of FUS prevented induction of *Chrne*-luciferase expression by agrin, indicating that FUS is required for induction of *Chrne* transcription in response to agrin (**Supplementary Figure 5**). Selective *Chrne* expression in subsynaptic nuclei is mediated by the ETS transcription factor Erm ⁴. Importantly, *Erm* knockdown largely decreased FUS-induced *Chrne* promoter activity (**Figure 5j**), while conversely, activation of *Chrne* promoter activity by Erm overexpression was severely blunted by FUS knock-down (**Figure 5k**). Since EWSR1, a protein of the FET family to which also FUS belongs, has been shown to physically interact with ERM ²², we postulated that these effects were mediated by direct physical interaction. Indeed, immunoprecipitation in HEK293 cells transfected with tagged versions of FUS and ERM revealed a direct interaction between both proteins (**Figure 5l**), and such interaction was also detected using

immunoprecipitation of endogenous proteins in both HEK293 and human myoblast cell lines (**Figure 5m-n**). Altogether, our results indicate that subsynaptic gene expression is mediated by the synergistic action of FUS and Erm on AchR encoding gene promoters.

Impaired endplate maturation in iPSC-derived myotubes from *FUS*-ALS patients

To explore the potential relevance of our findings in mutant *Fus* mouse models for human *FUS*-ALS, we studied endplate maturation and NMJ formation in cultured myotubes and motor neuron-muscle co-cultures derived from *FUS*-ALS patients and neurologically healthy control subjects. Induced pluripotent stem cell (iPSC) lines derived from juvenile ALS patients carrying a c.1483delC deletion leading to a R495QfsX527 frameshift mutation (FUS1) or a c.1504delG deletion leading to an D502Tfs*27 frameshift mutation (FUS2) have been previously described²³. Two control lines (CNTL1 and CNTL2) were generated from neurologically healthy volunteers, and an additional control line (CNTL3) was obtained by correcting the c.1483delC deletion in the R495QfsX527 iPSCs by CRISPR/Cas9 technology, thus providing an isogenic control²³ (**Figure 6a**).

As a first paradigm to test the effect of ALS-mutant FUS on AChR clustering and endplate maturation, patient and control iPSCs were differentiated in myogenic cells and subsequently in myotubes. Myogenic cells were grown in spheres for 7 weeks and then plated to form multinucleated myotubes (**Supplementary Figure 6a**; see methods for details)²⁴. Extensive characterization of expression levels and localization of myogenic markers confirmed appropriate myogenic proliferation and differentiation in mature myotubes, with no significant differences between *FUS*-ALS and control. Indeed, transcript levels of the myogenic markers *PAX7* and *MYOG* were not significantly different between *FUS*-ALS and control at different time points during myoblast proliferation and myotube differentiation (**Supplementary Figure 6b**). Furthermore, MYOG protein displayed the expected nuclear localization, and the contractile filament myosin heavy chain (MHC) and the muscle-specific intermediate filament desmin were characteristically localized to the cytoplasm (**Supplementary**

Figure 6c). In addition, the microfilament protein α -actinin, which is necessary for attachment of actin filaments to the sarcomeric Z-disks, was indeed localized to Zdisks (**Figure 6b,c**). Finally, the muscle cells stained positive for the skeletal muscle ryanodine receptor isoform RyR1 and the voltage-dependent dihydropyridine receptor alpha subunit (**Supplementary Figure 5c**, arrowheads), both intracellular calcium channels that mediate calcium release from the sarcoplasmic reticulum, an essential step in muscle contraction. Surprisingly, FUS predominantly localized to the nucleus in both control and *FUS*-ALS myotubes (**Figure 6c; Supplementary Figure 6c**), in contrast to the previously reported cytoplasmic mislocalization of ALS-mutant FUS in motor neurons²³.

To characterize endplate morphology in *FUS*-ALS and control myotubes, endplates were visualized by fluorescently labeled BTX and categorized in three groups based on AChR clustering: (i) diffuse puncta, (ii) aligned puncta, and (iii) dense cluster (**Figure 6b**), reflecting subsequent steps in endplate maturation. This analysis revealed impaired endplate maturation in *FUS*-ALS myotubes as compared to control (**Figure 6b**).

Finally, expression of AChR subunit genes was evaluated at different time points during myoblast proliferation and myotube differentiation. Transcript levels of the AChR gamma (*CHNRG*) and epsilon (*CHNRE*) subunits were not significantly different between *FUS*-ALS and control (**Supplementary Figure 6b**). In contrast, transcript levels of the AChR alpha1 subunit were substantially reduced in *FUS*-ALS myotubes (**Supplementary Figure 6b**), consistent with the observed endplate maturation defect and the data in mutant *Fus* mouse models and C2C12 cells.

ALS-mutant FUS is intrinsically toxic to motor neurons and myotubes

During development, before motor axons reach their muscle targets, clusters of AChRs are already 'pre-patterned' on muscle fibers. However, innervation of muscle fibers by motor axons induces a major rearrangement of the postsynaptic compartment, including increases in number, stability, density and clustering of AChRs^{1,2}. To evaluate the effect of motor innervation on endplate maturation, we co-cultured motor neurons and myotubes, following our previously established protocol²⁵. Wild type (CNTL) or *FUS*-ALS

motor neurons and myotubes were differentiated separately and subsequently co-cultured for three weeks in all possible CNTL/FUS combinations. Similar to myotube monocultures, endplate maturation was evaluated by categorizing endplate morphology, but a fourth category of 'pretzel'-shaped endplates (most mature) was added and only endplates innervated by neurofilament-positive motor axons were included (**Figure 6d,e**).

Consistent with the above-described endplate maturation defect in myotube monocultures, *FUS*-ALS myotubes co-cultured with CNTL motor neurons displayed significantly less mature endplates as compared to CNTL-CNTL co-cultures (**Figure 6d**). Co-culturing of *FUS*_R495QfsX527 (*FUS1*) motor neurons and myotubes significantly aggravated the endplate maturation defect (**Figure 6d**), suggesting that at least for this *FUS* mutation, mutant motor neurons have a detrimental effect on endplate maturation. Consistent with this notion, co-culturing of *FUS*-ALS motor neurons with CNTL myotubes was sufficient to induce an endplate maturation defect (**Figure 6d**). To solidify these data, we measured the average size of single puncta within endplates. This analysis revealed that, as compared to CNTL-CNTL co-cultures, any combination containing *FUS*-ALS motor neurons and/or myotubes displayed significantly reduced single particle size (**Supplementary Figure 6d**), again indicative of defective AChR clustering in the presence of *FUS*-ALS cells.

Immunostaining for FUS, AChR, neurofilament heavy chain (NF-H) and DAPI (**Figure 6e**) revealed that in cultures derived from CNTL motor neurons and myotubes, FUS was strongly expressed in motor neuron nuclei (indicated by *) and in subsynaptic nuclei of myotubes (indicated by **). In cultures from CNTL myotubes and *FUS* mutant motor neurons, FUS localized to both nucleus and cytoplasm of motor neurons (indicated by *), and FUS labeling in subsynaptic nuclei appeared reduced (indicated by **). Also in co-cultures of *FUS* mutant motor neurons and myotubes, FUS levels appeared reduced in subsynaptic nuclei (**Figure 6e**, indicated by **).

We further analyzed expression of myogenic differentiation markers and AChR subunits in motor neuron-myotube co-cultures. Since myotube differentiation was induced by

PAX7 overexpression, we first assessed PAX7 levels. No significant differences in PAX7 expression was found across the different genotypic combinations (**Supplementary Figure 6e**), indicating that similar differentiation efficacies could be expected for the various combinations. However, in D502Tfs*27 (FUS2) 'full' mutant co-cultures, *MYOD* and *MYOG* transcript levels were significantly reduced, suggesting impaired myogenic differentiation (**Supplementary Figure 6e**). Furthermore, MYOG expression levels were also significantly reduced when either motor neurons or myotubes were FUS2 mutant. In addition, transcript levels of AChR alpha 1 and gamma subunits were substantially reduced in FUS2 full mutant co-cultures, while transcript levels of the AChR epsilon subunit were not significantly different across combinations. These data are consistent with the most pronounced endplate differentiation defect in *FUS*-ALS full mutant co-cultures.

Muscle biopsies from *FUS*-ALS patients show muscle atrophy, endplate denervation, FUS mislocalization and loss of FUS enrichment in subsynaptic nuclei

Finally, we analyzed muscle biopsies from a healthy control and three *FUS*-ALS patients with R495QfsX527 (FUS1, obtained from the same patient as our FUS1 iPSC cell line), K501R (FUS2), and (FUS3) mutations. FUS1 and FUS2 had juvenile spinal and bulbar onset respectively, and FUS3 presented at the age of 39 with spinal onset (**Figure 7a**). H&E staining revealed neurogenic muscle atrophy in each of the three *FUS*-ALS patients, with groups of small angulated fibers, increased density of muscle nuclei and increased presence of connective tissue, in particular in patients FUS2 and FUS3 (**Figure 7b**). Immunostaining for synaptophysin (SYN), AChR, FUS and DAPI revealed endplate denervation in *FUS*-ALS muscle biopsies, and endplate surface area appeared reduced (**Figure 7c**). Furthermore, similar to muscles of *Fus* ^{Δ NLS/+} mice, FUS mislocalization to the cytoplasm was apparent in *FUS*-ALS muscles, and FUS appeared enriched in subsynaptic nuclei in the control biopsy, but not in *FUS*-ALS biopsies (**Figure 7c**).

Discussion

Motor neuron degeneration in ALS is thought to occur in a retrograde fashion: NMJs are affected first, followed by motor axonal degeneration and finally degeneration of motor neuron cell bodies. This 'dying back' pattern of motor neuron degeneration has been reported in a single sporadic ALS (sALS) patient⁸ and in mouse models of familial ALS (fALS) caused by mutations in SOD1⁷⁻⁹. It is however unclear whether this is also the case for other forms of fALS, and for the broad population of sALS patients. In this study, skeletal muscle biopsies from *FUS*-ALS patients presented strong FUS mislocalization, smaller NMJs and neurogenic muscle atrophy but why patients harboring FUS mutations present such aggressive disease phenotypes and the possible involvement of mutant FUS toxicity to skeletal muscles and as a result the peripheral synapse remains unclear. Therefore, we investigated NMJ morphology in mouse models of *FUS*-ALS that carry a homozygous or heterozygous *Fus* mutation that results in deletion of the last 20 amino acids of the endogenous FUS protein, similar to mutations found in human *FUS*-ALS patients¹², affecting the NLS and thus impairing FUS nuclear import¹³ and being associated with early disease onset and fast disease progression²⁶⁻²⁸. Although the innervation of muscle endplates in hind limb muscles of newborn *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} pups was not affected, the endplate surface area and the total number of endplates in an entire hind limb muscle were significantly reduced, while the total number of muscle fibers was not altered. The total number of endplates was also reduced in *Fus*^{-/-} newborn pups, indicating that a loss-of-function mechanism underlies this post synaptic defect. However, the average endplate surface area was not changed in *Fus*^{-/-} pups, indicating that a gain-of-toxic-function mechanism underlies the reduced endplate area in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} muscles. Ultrastructural analysis confirmed the predominantly post synaptic defect in both *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and *Fus*^{-/-} pups, although in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} muscles, signs of presynaptic degeneration were evident as well, indicating not only muscular but also motoneuronal involvement. Consistently, in iPSC-derived myotube cultures and in motor neuron/myotube co-cultures from *FUS*ALS patients, endplate maturation was significantly impaired, underscoring the potential relevance of our findings in mouse

models for human *FUS*-ALS. Importantly, also in adult *Fus*^{ANLS/+} mice, which recapitulate the genetic situation in the vast majority of *FUS*-ALS patients, endplate surface area was significantly reduced, and endplate denervation was already detected at one month of age, and this defect progressively worsened with age. Given the fact that loss of motor neuron cell bodies only occurs after the age of 10 months¹⁵, these data clearly indicate that in this *FUS*-ALS mouse model motor neuron degeneration occurs in a dying back pattern, consistent with what others observed recently in transgenic mice overexpressing wild type or ALS-mutant human FUS^{29,30}.

Another unresolved question in the field is whether skeletal muscle fibers are merely bystanders or rather actively contribute to motor neuron degeneration in ALS. This conundrum has been investigated in mutant SOD1 mouse models of ALS, with conflicting results. Indeed, two studies reported that reducing mutant SOD1 expression in skeletal muscle of mutant SOD1 mice does not affect disease course, neither did increasing muscle fiber number and diameter by follistatin expression^{31,32}. On the other hand, selective expression of ALS-mutant SOD1 G93A in skeletal muscle was reported to result in progressive muscle atrophy, significant reduction in muscle strength, alteration in the contractile apparatus and mitochondrial dysfunction³³. Strikingly, another study reported that skeletal muscle-restricted expression of wild type, G37R and G93A SOD1 resulted in limb weakness, paresis and motor defects, associated not only with severe skeletal muscle pathology, but also with marked NMJ abnormalities and spinal motor neuron pathology³⁴. Furthermore, loss of skeletal muscle-specific microRNA miR-206 accelerates NMJ denervation and disease progression in SOD1 G93A mice³⁵. In this study, we show that selective reversal of the *Fus*^{ANLS} allele to wild type in skeletal muscle restored the subcellular localization of FUS (from cytoplasmic mislocalization to appropriate nuclear localization) and rescued the reduced endplate surface area in *Fus*^{ANLS/ANLS} newborn pups. These results show that this post synaptic defect is attributable to intrinsic toxicity of the FUS^{ANLS} protein in skeletal muscle, suggesting a possible non-cell-autonomous contribution of skeletal muscle to the dying back neuronopathy in *FUS*-ALS.

Besides toxicity in skeletal muscle, intrinsic toxicity of mutant FUS in motor neurons is likely a key event in triggering motor neuron degeneration in *FUS*-ALS. Indeed, ultrastructural analysis of motor terminals in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} muscles, as well as in transgenic mice overexpressing wild type or P525L mutant FUS revealed presynaptic defects^{29, 30}. Furthermore, selective overexpression of FUS P525L in motor neurons was sufficient to induce progressive motor neuron loss and NMJ denervation³⁰, and reversal of the *Fus*^{ΔNLS} allele to wild type in both *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and *Fus*^{ΔNLS/+} mice prevented progressive motor neuron loss^{14, 15}, indicating that expression of ALSmutant FUS in motor neurons is both necessary and sufficient to induce motor neuron loss. Similarly, in our human motor neuron/myotube co-cultures, motor neurons derived from *FUS*-ALS patients induced defective maturation of neuromuscular endplates, even when myotubes were derived from healthy control subjects. Intriguingly, however, in spite of preventing loss of motor neuron cell bodies in adult heterozygous *Fus*^{ΔNLS/+} mice, ChAT-cre delayed, but did not prevent the development of motor deficits in these mice¹⁵, suggesting the involvement of cell types other than motor neurons. Our findings that toxicity of the FUS^{ΔNLS} protein in myotubes induces NMJ morphology defects suggests that skeletal muscle fibers may contribute to the development of motor deficits in adult *Fus*^{ΔNLS/+} mice, although this remains to be experimentally proven.

The reduced neuromuscular endplate size in hind limb muscles of both newborn *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and adult *Fus*^{ΔNLS/+} mice, as well as the reduced total number of endplates in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and *Fus*^{-/-} muscles prompted us to investigate a possible role of FUS in regulation of AChR subunit (*Chrn*) gene expression. Indeed, downregulation of subsynaptic gene expression, as is the case in *Erm* mutant mice, was associated with a substantial reduction in endplate surface area⁴. Consistent with a role for FUS in *Chrn* gene regulation, knock-down of FUS in C2C12 mouse myoblast cells substantially reduced expression of each of the AChR subunits (α1, β1, γ, δ and ε). Furthermore, in *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} muscles, transcript levels of the β1, γ and δ subunits were significantly reduced, and in adult *Fus*^{ΔNLS/+} muscles, expression of the α1, γ and ε subunits were significantly reduced. In addition, AChRα1 subunit expression was significantly reduced

in *FUS*-ALS myotube cultures, and in *FUS*-ALS motor neuron/myotube co-cultures, expression of AChR α 1 and AchR γ was diminished. Together, these findings indicate the *FUS* stimulates expression of *Chrn* genes, and this function is compromised in *FUS*-ALS mouse and cell culture models.

After innervation of skeletal muscles during development, expression of AChR subunits and other 'synaptic' genes becomes restricted to subsynaptic nuclei^{1,2}. At the molecular level, this is mediated by agrin secreted from motor nerve terminals, which binds to Lrp4 in the postsynaptic membrane, resulting in MuSK activation and subsequent activation of Rac and JNK, ultimately resulting in phosphorylation and activation of Erm and possibly other ETS family transcription factors, which drive expression of *Chrn* genes, *Musk*, and other synaptic genes. The transcription factor ERM is highly enriched at subsynaptic nuclei, and when mutated in mice, many genes highly expressed in subsynaptic nuclei are downregulated⁴. On the other hand, muscle denervation results in re-expression of *Chrn* genes in nonsynaptic nuclei and thus loss of selective expression of *Chrn* genes in subsynaptic nuclei. Interestingly, consistent with a role for *FUS* in stimulating synaptic gene expression, we found *FUS* enrichment in subsynaptic nuclei, and this enrichment was lost upon denervation. Furthermore, in *Fus* ^{Δ NLS/+} mice, *FUS* enrichment in subsynaptic nuclei is disrupted and expression of AChR subunit genes is reduced. Experiments in C2C12 cells revealed that *FUS* modulates expression of AChR subunit genes through regulation of transcription, as knock-down of *FUS* reduced and *FUS* overexpression increased the promoter activity of both the *Chrnd* and *Chrne* genes. Importantly, *FUS* was required to mediate induction of *Chrne* promoter activity by neural agrin, suggesting that *FUS* is required for ERM function. Consistently, ChIP experiments showed that *FUS* binds to the promoter region of *Chrn* genes, and co-IP showed that *FUS* and ERM proteins interact with each other. Last, *FUS*-mediated induction of *Chrne* promoter activity was Erm-dependent, and Erm-mediated induction of the *Chrne* promoter was *FUS*-dependent.

Of note, it was recently reported that ERM also directly interacts with EWS (Ewing's sarcoma breakpoint protein)²², a protein which, together with *FUS* and TAF-15,

constitutes the FET protein family. FUS and EWS are highly homologous, and both proteins contain a low complexity (LC) domain, three RGG domains, an RNA recognition motif (RRM) and a C4 Znf domain¹⁰. This suggests that FET proteins may be critical regulators of multiple ETS transcription factor activities. In particular, besides NMJ development and maintenance, the synergistic action of ETS transcription factors and FET proteins may play a role in development of malignant diseases²². Taken together, our data suggest a model in which agrin-Lrp4-MuSK signaling results in activation of recruitment of FUS and Erm to promoter regions of subsynaptic genes, increasing their expression (Figure 5).

To the best of our knowledge, this is the first time that an ALS gene is directly implicated in NMJ differentiation and stability. Given the fact that NMJ pathology is considered an early event in ALS pathogenesis, this may constitute an important novel insight. Furthermore, our findings suggest a possible role for FUS in other neuromuscular diseases with prominent NMJ pathology, including myastenic syndromes, peripheral neuropathy and spinal muscular atrophy. Our data further indicate that ALS-mutant FUS is intrinsically toxic to both motor neurons and skeletal muscle, implying that therapeutic approaches for *FUS*-ALS – and possibly all forms of ALS – should ideally target both cell types. In conclusion, in this study we uncovered that FUS and ERM collaborate to promote the transcription of AChR subunit genes in subsynaptic nuclei. Distortion of this novel FUS function in *FUS*-ALS mouse and cell models suggests that intrinsic toxicity of mutant FUS in skeletal muscle may contribute to the dying-back motor neuronopathy in *FUS*-ALS patients.

Materials and methods Compliance with ethical standards

Mouse experiments were approved by the local ethical committee from Strasbourg University (CREMEAS) under reference numbers 2015070711529814 and 2016021114497517, and by the LANUV-NRW under reference numbers 8402.04.2011.A100 and 84-02.04.2016.A166. Human hair and skeletal muscle biopsy donors gave informed consent for the study prior to sampling. All studies with human material were in accordance with the ethical committee of Ulm University (Nr. 0148/2009 and 265/12 for hairs and 12/09 for muscle biopsies) and in compliance with the guidelines of the Federal Government of Germany (Nr. O.103). Experiments were in accordance with the Declaration of Helsinki concerning Principles for Medical Research containing Human Subjects.

Animals

Transgenic mice were housed in the Faculty of medicine from Strasbourg University and in the animal facility of the Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, with 12/12 hours of light/dark cycle and unrestricted access to food and water.

Fus knock-in mice have been generated in the Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, Strasbourg) and were previously described^{14, 15}. This mouse strain expresses a truncated FUS protein that lacks the PY-NLS, which is encoded by exon 15 of the *Fus* gene. This mutation can be reverted to a wild type FUS protein upon CREmediated recombination^{14, 15}. Mice heterozygous and homozygous for the targeted allele will hereafter be referred to as *Fus*^{ΔNLS/+} and *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS}, respectively. *Fus* knock-out mice have been generated by the transgenesis facility of the Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, using ES cells obtained from the European Conditional Mouse Mutagenesis Consortium (EUCOMM) and were previously described^{14, 15}. *MyoD*^{Cre} mice have been described^{16, 17}. The genetic background of all mice used in this study is C57Bl6/J.

Histology, immunohistochemistry and morphometric analysis

NMJ morphology in newborn mice

Newborn pups were sacrificed by decapitation and the tip of the tail was taken for genotyping. The skin was removed from the body of the pups, followed by fixation in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS on ice. Next, pups were washed in PBS (3x 15 min) and stored in PBS containing 0.02% sodium ethylmercurithiosalicylate at 4°C. After genotyping, gastrocnemius and tibialis anterior muscles were dissected, washed in PBS and embedded in 3% agarose in PBS. A vibratome was used to cut 100 µm longitudinal sections which were transferred to PBS in a 24-well plate. Sections were used immediately for immunostaining or stored at 4°C for up to 4 weeks.

Immunostainings were done free-floating in a 24-well plate. Sections were permeabilized for 30 min in PTT (PBS + 0.5% Triton X-100, 0.1% Tween 20), washed in PBS (3x 15 min) and blocked for 1 h in 10% normal goat serum in PBT (1% BSA, 0.5% Triton X-100 in PBS). Sections were incubated with mouse anti-SV2 (DSHB, 1/10), mouse anti-synaptophysin (Millipore, 1/250) and/or mouse anti-NF (2H3, DSHB, 1/100) primary antibodies in PBT at 4°C overnight. Sections were washed in PBS (10 x 30 min) and incubated with goat-anti-mouse-Alexa-488 (Invitrogen, 1/500) and α bungarotoxin Alexa Fluor 594 conjugate (BTX-Alexa-555, Life Technologies, 1/1000) in PBT at 4°C overnight. Sections were washed in PBT (2 x 30 min) and PBS (8 x 30 min), and mounted on microscopy slides in Vectashield mounting medium.

For quantification of the total number of endplates, BTX-labeled endplates were identified using an epifluorescence microscope (Zeiss Axio Imager Z2, 20x magnification) and a manual counter was used to count all endplates in the different focal planes of each section. Endplate numbers in all sections of the same muscle were added up to obtain the total number of endplates per muscle.

For quantification of endplate area and innervation status, sections stained with antiSV2 and BTX-Alexa-568 were imaged at a 63x magnification on a Zeiss LSM700 confocal microscope. For each muscle, two sections were imaged, and for each section, images of 5 distinct fields were obtained. Fiji software was used to obtain maximum intensity

projections of a limited number of confocal sections (5 to 10), in order to generate images of a select number of individual, non-overlapping endplates. This allowed for analysis of ~100 to 150 endplates per muscle. The surface area of each of these endplates was determined using the “freehand selection” tool in Fiji to delineate endplates. The average endplate area per muscle was calculated and used for statistical analysis to compare endplate area between genotypes. To quantify innervation status, composite images of the red and green channels were generated. Endplates that were apposed by at least three SV2-positive ‘dots’ were scored as innervated, and the percentage of innervated endplates per muscle was calculated and used for statistical analysis.

Muscle fiber number in newborn mice

The extensor digitorum longus (EDL) muscle was used for quantification of the total number of muscle fibers, as this muscle is smaller than the tibialis anterior or the gastrocnemius, with a lower number of muscle fibers, what makes the quantification of the total number of muscle fibers practically feasible. Furthermore, all fibers of the EDL muscle run from tendon to tendon, so that a cross section through the middle part of the muscle allows for quantification of the total number of muscle fibers. Newborn pups were sacrificed by decapitation and the tip of the tail was taken for genotyping. EDL muscles were freshly dissected and directly embedded in O.T.C. compound (Sakura) following a ‘cryo-no-fix’ procedure. 16 μm transverse sections were made using a cryostat and stored at -80°C or immediately used for immunostaining using antidystrophin antibodies to selectively label muscle plasma membranes.

For immunostaining, sections were incubated at room temperature and hydrated with PBS (2 x 10 min). Sections were briefly fixed (15 min) in 4% PFA in 0.1 mM sucrose, washed with PBS (2 x 10 min), and incubated with mouse anti-dystrophin (MANDRA1, DSHB, 1/20) primary antibody in PBS with 2% donkey serum and 0.1% Triton X-100 at 4°C overnight. Sections were subsequently washed with PBS (2 x 10 min), followed by Alexa-568-conjugated anti-mouse secondary antibody in PBS with 2% donkey serum and

0.1% Triton X-100 for 2h at room temperature. Sections were washed in PBS (3 x 10 min) and mounted in mounting medium with DAPI.

For quantification of the total number of muscle fibers, dystrophin-stained sections stained were imaged at a 10x magnification on a Zeiss LSM700 confocal microscope. Fiji software was used to count the total number of muscle fibers per section (multipoint selection tool).

NMJ morphology in adult mice

Mice were anesthetized with intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine chlorhydrate and 5mg/kg xylazine and transcardially perfused with 4% PFA in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. Gastrocnemius and tibialis anterior muscles were dissected, post-fixed overnight in 4% PFA at 4°C, and washed three times with PBS. Muscles were 'teased' into muscle fiber bundles and stained overnight at room temperature with antibodies against neurofilament (custom made, 1/100) and synaptophysin (custom made, 1/100) in PBS-0.1% Triton X-100. After three washes with PBS-0.1% Triton X100, muscles were stained with Alexa-488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Jackson, 711-547-003, 1/500), BTX-Alexa-594 (Sigma, T195; 1/500) and hoechst (Sigma, B2261, 1/1000). Finally, muscles were washed and mounted in aquapolymount (Polysciences, 18606-5). Z-stack images (2µm optical section, objective x63) were acquired under a confocal microscope (Leica SP5, Leica Microsystems). Excitation rays were sequential argon laser 488nm, diode 561nm, Helium Neon laser 633nm. Emission bandwidths were 500-550nm for Alexa488, 570-620nm for Alexa594, and 460nm for Hoechst. Endplate area was quantified using Image J software.

MyoD-Cre efficiency in newborn mice

To evaluate the efficiency of MyoD^{iCre} mice^{16, 17} to excise loxP-flanked genomic sequences, MyoD^{iCre/+} mice were crossed to ROSA^{mT/mG} reporter mice¹⁸. The latter mice express membrane-targeted tandem dimer Tomato (mT) prior to Cre-mediated

excision and membrane-targeted GFP (mG) after excision (Figure S1A). Adult $MyoD^{iCre/+}$; $ROSA^{mT/mG}/+$ (experimental) and $ROSA^{mT/mG}/+$ (control) mice were anesthetized by i.p. injection of a mixture of ketamin (100mg/kg) and xylazin (10mg/kg). Tibialis anterior muscles were dissected and fixed for 2h in 4% PFA in PBS on ice. Muscles were washed in PBS (3 x 15 min) and incubated in 30% sucrose in PBS until the muscles had sunk to the bottom of the tube (~24h). Muscles were embedded in O.T.C. compound (Sakura) and 20 μ m sections were made on a cryostat.

For immunostaining, slides were incubated for 20 minutes in antigen retrieval buffer (2.94 g Tri-Sodium citrate and 0.5 ml Tween 20 in 1 L distilled water, pH 6) that had been heated in a microwave till boiling. Slides were washed in PBS (2 x 10 min) and incubated with chicken anti-GFP (Aves Labs, GFP-1020, 1/300) and rabbit anti-RFP (MBL Life Science, PM005, 1/250) primary antibodies in 2% donkey serum /0.1% Triton X-100 in PBS at 4°C overnight. Next, slides were washed in PBS (2 x 10 min) and incubated with Alexa-488-conjugated anti-chicken and Alexa-568-conjugated antirabbit secondary antibodies (1/300) in PBS with 2% donkey serum and 0.1% Triton X100 for 2h at room temperature. Finally, slides were washed in PBS (2 x 10 min) and incubated with Alexa Fluor 647 phalloidin (Thermo Fisher Scientific, 1/20) at room temperature for 15 min, rinsed in PBS (5 min) and mounted in DAPI-containing mounting medium (Vectashield).

FUS/phalloidin/DAPI staining on newborn muscles

To evaluate the efficiency of $MyoD^{iCre}$ mice to revert the $Fus^{\Delta NLS}$ allele to wild type, $MyoD^{iCre/+}$ males were crossed to $Fus^{\Delta NLS/+}$ females, and timed matings were set up between $MyoD^{iCre/+}$; $Fus^{\Delta NLS/+}$ males in the offspring and $Fus^{\Delta NLS/+}$ females. The resulting newborn pups were sacrificed by decapitation and the tip of the tail was taken for genotyping. The skin was removed from the body of the pups, followed by fixation in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS on ice. Next, pups were washed in PBS (3x 15 min) and stored in PBS containing 0.02% sodium ethylmercurithiosalicylate at 4°C. After genotyping, tibialis anterior muscles were dissected from $MyoD^{iCre/+}$; $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ (experimental), $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ and $MyoD^{iCre/+}$ (control) pups, washed in PBS and

incubated overnight in 30% sucrose in PBS at 4°C. Muscles were embedded in OCT and 16 µm thick cryosections were made with a cryostat.

For immunostaining, sections were incubated at room temperature and hydrated with PBS (2 x 10 min). Sections were incubated with rabbit anti-FUS (Sigma, HPA008784, 1/150) primary antibody in PBS with 2% donkey serum and 0.1% Triton X-100 at 4°C overnight. Sections were subsequently washed with PBS (2 x 10 min), followed by Alexa-488-conjugated anti-rabbit secondary antibody in PBS with 2% donkey serum and 0.1% Triton X-100 for 2h at room temperature. Sections were washed in PBS (3 x 10 min) and incubated with Alexa Fluor 647-conjugated phalloidin (Cell Signaling, 8940, 1/20) for 30 min at room temperature. Sections were washed in PBS (3 x 10 min) and mounted in mounting medium with DAPI (VectaShield) for confocal imaging.

FUS immunostaining in adult muscles

Unfixed muscles embedded in OCT (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura, 4583) were frozen in melting isopentane after cryoprotection in PBS 30% sucrose. Serial cuts of 14µm thick were made with cryostat (Leica CM 3050S) and deposited on Superfrost® slides (Superfrost, VWR, 631-0448). Slides were dried 20min then fixed with 4% PFA in 0.1mM sucrose 15min at room temperature. After washes with PBS, AChR clusters were stained with Alexa Fluor 594-conjugated α -Bungarotoxin (Sigma, T195; 1/500) during 1h at room temperature. Unspecific binding sites were blocked with 0,1% TritonX100 and 3% BSA in PBS, 2h at room temperature. Rabbit anti FUS antibody (Bethyl, A300-294A, 1:1000) was incubated overnight at 4°C. After rinsing in PBS, anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Jackson, 711-547-003, 1/500) was incubated 2h at room temperature. Finally, sections were washed with PBS followed by water and mounted in aquapolymount (Polysciences, 18606-5). Fus extrasynaptic and subsynaptic nuclei intensity was measured using Image J software.

Axotomy experiments

For axotomy, intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine chlorhydrate and 5mg/kg xylazine was performed on wild type C57Bl6/J mice. 1-2 mm of sciatic nerve was removed and lidocaine was deposited on surgical wound. Skin was sutured and mice were daily surveyed until sacrifice 5 days after surgery.

Electron microscopy

Gastrocnemius muscles of newborn mice were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde and 2.5% PFA in cacodylate buffer (0.1M, pH 7.4), postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer for 1 hour at 4°C and dehydrated through graded alcohol (50, 70, 90, 100%) and propylene oxide for 30 minutes each. Samples were embedded in Epon 812. Ultrathin sections were cut at 70nm, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined at 70kv with a Morgagni 268D electron microscope. Images were captured digitally by Mega View III camera (Soft Imaging System).

C2C12 myoblast culture experiments

C2C12 myoblast cells (ATCC® CRL-1772™) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% Fetal Bovine Serum (Fisher scientific, 11531831) and 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma, P4333) at 37 °C in an incubator with 5% CO₂. Between 60 and 80% of confluency, myoblasts were differentiated in myotubes with differentiation medium (identical medium, with 0.1% Fetal Bovine Serum). Culture medium was changed every day and transfections were performed between passages 5 and 15.

siRNA Transfection

C2C12 were cultured in 6-well plates until 60% of confluency. Cells were transfected with siRNA in differentiation medium using Lipofectamine RNA iMAX (Fischer scientific sas, 13778150) according to the manufacturer's instructions. siRNA against FUS and negative control siRNA were provided by Dharmacon (respectively D-001810-10-20 and L-051741-00-0050). Cells were harvested 48h after transfection.

Plasmid Transfection and luciferase assay

C2C12 were cultured in 24 well-plates until 80% of confluency. Transfection was performed in differentiation medium with expression and reporter plasmids using TransIT-X2 (MIR6000, Myrus) according to the manufacturer's instructions. Expression vectors used for transfections were: pCMV empty plasmid, pCMV-MycFUS (expressing N-terminal myc-tagged human wild type FUS) and pCMV-Myc-FUSR495X. Reporter plasmids were pcDNA3.1-Chrne-luc, pcDNA3.1-chrnd-luc and pcDNA3.1-CMV-luc obtained from L. Schaeffer (Lyon, France)⁵. After 24h of transfection, proteins were extracted and luciferase activity was measured (Promega, E4550) and normalized by total proteins measured with BCA assay (Interchim, UP95424A, UP95425A). The following antibodies were used to perform immunofluorescence on transfected cells: anti-MYC (sigma, M4437) and anti-Fus (Bethyl, A300-294A).

RNA extraction and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from C2C12 or muscles (tibialis or gastrocnemius) of mice using TRIzol[®] reagent (Life Technologies). 1 µg of RNA was reverse transcribed with iScript[™] reverse transcription (Biorad, 1708841). Quantitative polymerase chain reaction was performed using Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad) and quantified with Bio-Rad software. Gene expression was normalized by calculating a normalization factor using H2A Histone Family Member X (H2AX), Histone Cluster 1 H2A Family Member C (H2AC), Histone Cluster 1 H2B Family Member C (H1H2BC) genes according to GeNorm software³⁶.

Primer sequences were as follows:

H2AX: F-TCCTGCCCAACATCCAGG, R-TCAGTACTCCTGAGAGGCCTGC
H2AC: F-CAACGACGAGGAGCTCAACAAG, R-GAAGTTTCCGCAGATTCTGTTGC
H1H2BC: F-AACAAGCGCTCGACCATCA, R-GAATTCGCTACGGAGGCTTACT
Chrna1: F-CCACAGACTCAGGGGAGAAG, R-AACGGTGGTGTGTGTTGATG
Chrb1: F-GGCAAGTTCCTGCTTTTCGG, R-CGTCCGGAAGTGGATGTTCA
Chrng: F-GAGAGCCACCTCGAAGACAC, R-GACCAACCTCATCTCCCTGA
Chrnd: F-CGC-TGC-TTC-TGC-TTC-TAG-GG, R-ATCAGTTGGCCTTCGGCTT
Chrne: F-CAATGCCAATCCAGACTG, R-CCCTGCTTCTCCTGACTC

Chromatin immunoprecipitation

1.08x 10⁷ of C2C12 cells differentiated during 48h, were washed with PBS and fixed in 1% PFA during 10 minutes. Glycine (0.125M) was added to stop the crosslinking reaction. After washes in PBS, cells were detached, centrifuged and resuspended in nuclei buffer (50mM Tris HCL pH8, 2mM EDTA pH8, 0.1%NP40, 10% glycerol, 1M Na butyrate, protease inhibitor 1x). After centrifugation, nuclei were resuspended in sonication buffer (50mM TrisHCL pH8, 10mM EDTA, 0.3% SDS, 1M Na butyrate, protease inhibitor 1x) and sonicated with Diagenode Bioruptor (B0102001 - 3 Cycles of 5 minutes - 30s on / 30s off). A fraction of sonicated chromatin was reverse cross linked and fragment size was checked. We used chromatin with fragment size 200-500 bp, and saved 0.3µg as 1% input. 30µg of chromatin was used for immunoprecipitation. Sonicated DNA was incubated overnight at 4°C with 10µg of primary antibodies against FUS (FUS-1: A300-294A - Bethyl, FUS-2: A300-293A - Bethyl), or without antibody (WAB) as negative control. Addition of 50µL of protein A/G beads (53133- Thermo Scientific) during 2h, followed by centrifugation and washes allowed chromatin immunoprecipitation. Beads were then resuspended in elution buffer (10mM Tris pH8, 1mM EDTA pH8), and DNA was reverse cross linked (0.2M NaCl, 50µg.mL of RNase, proteinase K 0.15%) during 3h at 65°C. DNA purification was performed with QIAquick[®] PCR Purification Kit (28106 – Qiagen). qPCR was performed with following primers :

Chnra: F-GACAAGCCTCTGACTCATGATCTATGT, R-CTGCCGGTCCTACTCCACCCTGGCT

Chnrd F: TCCTGCCTGGGATCTTTTCGTTCTGCCCTTG, R-GTTTGTCTTCCCTCAGCCTGTTGCT GTGA

Chnre: F-GATGACAGGCCTTGTGGATT, R-GACAAGCTTGAGGGAACAGG

Mecp2 (positive control for Fus): F- AGTATGACTCTTCCCTACCAGGAG, R-CTGATTCAAATTT GGCTCCCT

H2AC (negative control for Fus) : F-CGCGAAACTTGCGTTTTTCAG, R- TTGGTGGTTATTTGGCCCT.

Data were presented normalized to 1% input.

Western blotting

Cells were washed in PBS1x and lysed in RIPA buffer (Tris 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, SDS 0.1%, Deoxycholate 0.5%, Triton 100X) containing protease inhibitor (Sigma P8340) and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma 8345). After centrifugation at

10 000rpm, 4°C during 10min, supernatant was saved and used to dose protein extract by using a BCA Assay (Interchim, UP95424A, UP95425A). Protein were denatured and SDS page were performed with 25µg of protein on criterion TGX stain free gel 4-20% (Biorad, 5678094). Proteins were blotted on nitrocellulose membrane using semi-dry Transblot Turbo system (BioRad, France) and blocked with 10% nonfat milk during 1h. Anti-Fus antibody (Proteintech, 18592-1-AP, 1:1000) was incubated overnight at 4°C in 3% non-fat milk. Washing were proceeded with washing buffer (Tris pH 7.4 1 M, NaCl 5M, Tween 20 100 %) and anti-rabbit HRP (PARIS, BI2407) was incubated 1h30 at room temperature. After successive washes, proteins were visualized with chemiluminescence using ECL Lumina Forte (Millipore, France) and chemiluminescence detector (Bio-Rad, France). Total proteins were detected with stain free gel capacity (Biorad, 5678094) and used to normalized.

Experiments on human iPSC- derived motor neurons and myotubes or human skeletal muscle biopsies

Reprogramming of human keratinocytes and cultivation of hiPSCs

Generation of human iPSCs from reprogrammed human keratinocytes was performed as previously described^{37, 38}, using a lentiviral multicistronic vector³⁹. All cell lines used were already characterized and previously published^{23, 40}.

Plucked human hair samples were cultivated in conditioned MEF medium supplemented with 50µg/ml ascorbic acid (Sigma-Aldrich, A4403), 10ng/ml FGF2 (Cell Guidance Systems, GFH146-50) and 10 µM Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor (Ascent Scientific, Asc-129). After outgrow of keratinocytes, medium was changed to Epilife (Gibco, M-EPICF, S0015) supplemented with 10 µM ROCK inhibitor. To obtain high reprogramming efficiency, cells were not passaged more than two times with kdispase (BD Bioscience 354235). Viral infection was performed using polybrene (sigma-Aldrich, TR-1003-G) on two consecutive days. Subsequently, cells were seeded on irradiated rat embryonic feeder cells and cultivated in hiPSC medium (Knockout DMEM, 20% Knockout Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific, 10828028), 1% NEAA (Gibco, 11140), 1%

GlutaMax™, 35050-038, 100µM βmercaptoethanol (Millipore, ES-007-E), 1% Antibiotic Antimycotic (Thermo Fisher Scientific, 15240062) supplemented with 50µg/ml ascorbic acid, 10ng/ml FGF2, 10µM ROCK inhibitor). Colonies displaying iPSC morphology were mechanically lifted and cultivated under feeder free conditions with mTeSR1 medium (Stem Cell technologies, 05850) at 37°C, 5% CO₂ and 5% O₂. hiPSCs were kept in culture maximally up to 35 passages.

All pluripotency tests and the spontaneous germ layer differentiation were performed as previously published^{40,41} or carried out according to manufacturer`s protocol.

Differentiation of motor neurons

Differentiation of hiPSCs into motor neurons was performed according to published protocols^{40,42}.

For embryoid bodies (EBs) formation, hiPSCs were cultured in suspension in EB medium (DMEM/F12 (Gibco, 31331), 20% Knockout Serum Replacement, 1% NEAA, 1% β-Mercaptoethanol, 1% Antibiotic-Antimycotic) in ultra low attachment flasks (Corning Costar, 734-4140). 10µM ROCK inhibitor was supplemented for the first 24 hours. Neuronal differentiation was induced by changing the medium to Differentiation medium 1 (DMEM/F12, 1% NEAA, 2µg/ml heparin (Sigma, H3149), 1% Antibiotic Antimycotic, 2% Hormone mix (24 nM Sodium Selenite (Sigma, S9133-1MG) + 16 nM Progesterone (Sigma, P6149-1MG) + 0.08 mg/ml Apotransferrin (Sigma, T2036-1G) + 0.02 mg/ml Insulin (SAFC, 91077C-1G) + 7.72 µg/ml Putrescin (Sigma, P7505-25MG)) supplemented with 10ng/ml GDNF (Peprotech, 450-10), 10ng/ml BDNF (Peprotech, 540-02), 10ng/ml IGF-1 (Peprotech, 100-11), 0.1µM cAMP (Sigma, D0260), 20µg/ml ascorbic acid) on day 4. EBs were seeded in Differentiation medium 1 on laminincoated (Sigma-Aldrich, 11243217001) plates on day 7. On day 10, medium was replaced with Differentiation medium 2 (Differentiation medium 1, containing 0.1µM of retinoid acid (Sigma-Aldrich, R2625-100MG)). On day 15, neurospheres were transferred into T75 low-attachment flasks containing Differentiation medium 3

(Differentiation medium 1, containing 1 μ M pumorphamine (Calbiochem, 540220), 0.1 μ M retinoid acid and 2% B27 (Gibco, 12587)). At day 28, up to 3 neurospheres were seeded on 35mm μ -dishes (Ibidi, 86694) pre-coated with Poly-L-Ornithin (Sigma, P4957) and coated with laminin. Medium was changed to Differentiation medium 4

(Differentiation medium 1, containing 0.05 μ M retinoid acid, 0.5 μ M pumorphamine and 2% B27). Conditioned motor neuronal medium was harvested 42 days after final plating. Conditioned medium was sterile filtered (0.21 μ m, Sarstedt, 83.1826.001) and stored at -20°C.

Differentiation of myotubes

Differentiation of myogenic cells from human iPSCs was performed basically as previously published using a spheres-based culture²⁴.

Briefly, hiPSCs were cultured in suspension using ultra low attachment flasks in Stemline medium (Sigma, SA3194) containing 100ng/ml FGF-2, 100ng/ml EGF and 5ng/ml heparan sulfate (Sigma, H7640-1mg). Cells were split weekly using a 2 min accutase (Sigma, A6964) digestion and media were exchanged every second day. After 6 weeks of cultivation, cells were transferred into single cells using accutase digestion and filtration through a 30 μ m pre-separation filter (Miltenyi Biotec, 130-041407). 200,000 Cells per well were seeded on glass coverslips in 24 well plates, coated with PLO and laminin. Medium was changed to DMEM (Gibco, 41965) containing 2% B27 and 1% Antibiotic-Antimycotic with a media exchange twice per week. After 8 weeks of final differentiation mature myotubes were obtained and fixed or lysed for analysis.

To perform co-cultivation of iPSC-derived muscle cells with iPSC-derived motor neurons, myogenic cells were differentiated using Pax7-induced stem cell-derived progenitors, as described^{25, 43}.

Generation of isogenic control cell line

An isogenic control cell line (CNTL2) was generated by inserting a cytosine in position 1483 and consequently correcting the mutation, using Clustered Regularly Interspaced

Short Palindromic Repeats (CRISPR) technology. This cell line was previously characterized and published²³.

The C-nucleotide was inserted using a customized guide RNA (TATGATCGAGGCGGCTACCGGG) and a sequence specific donor vector purchased from Genewiz, containing the respective template with the C-nucleotide insertion. DNA transfection into patient-derived iPSCs was performed using Amaxa nucleofection (Lonza, VPH-5012). Subsequently, single cell-derived colonies were screened by a PCR-based approach. Total DNA was isolated using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, 51306). The region of interest was amplified by PCR using sequence specific primers (TCTAGGTCTTGCCTATTCCCC, GTGATCAGGAATTGGAAGGTTAC) and the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, F-530L).

Quantitative Real-time PCR

Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74106) according to the manufacturers' protocol and eluted in 40 µl RNase-free water.

First strand synthesis and quantitative real-time-PCR amplification were performed in a one-step, single-tube reaction using the QuantiFast SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen, 204174) and the Rotor-Gene-Q real-time PCR machine model 2-Plex HRM

(Qiagen) in a total reaction volume of 20 µl. Reactions were performed in 0.1 ml strip tubes and were composed of 1 µl of RNA, 10 µl QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0.2 µl RT Enzyme, 6.8 µl RNase-free water and 2 µl of QuantiTect primer (0.5 µmol). qRT-PCR cycling conditions were as follows: 1 cycle Reverse Transcription of 10 min at 50°C, 1 cycle Denaturation of 5 min at 95°C, 40 cycles of 5 sec at 95°C for denaturation, 10 sec at 60°C for annealing and elongation. The cycle threshold (C_T) for fluorescence detection were calculated and set by the Rotor-Gene Q Software version 2.0.2 (Qiagen) at 10^{-2} norm. fluorescence. All results are shown relative to the reference-housekeeping gene hydroxymethylbilane synthase (*HMBS*) to obtain values for relative quantification. QuantiTect Primer pairs were purchased from Qiagen.

Immunocytochemistry

For immunocytochemistry, cultures were fixed using 4% paraformaldehyde (Merck) and 10% sucrose (Roth, 4621.1) in phosphate buffered saline (DPBS, Gibco, H15-001) for 15 min. After washing, samples were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Roche, 10789704001) for 10 min. After blocking with 5% FBS (Gibco, 10500) and 10% goat serum (Millipore, S26-100mL) in DPBS for 1 hour, primary antibodies rabbit anti-FUS (Bethyl Labs, Montgomery, A300-294A, 1;1000), rabbit anti-FUS (Sigma, HPA008784, 1:1000) chicken anti-NF-H (Antibodies online, ABIN1842223, 1:10.000), mouse antiactinin (Sigma, A7811, 1:500), mouse anti-Desmin (Dako, M0760, 1;500), rabbit antiMyosin heavy chain (R&D Systems, MAB4470, 1:500), mouse anti-MyoG (Millipore, MAB3876), anti-Dihydropyridine Receptor alpha (Millipore, MAB427. 1:500), anti-Ryanodine receptor (Millipore, AB9078. 1:500), α -Bungarotoxin conjugated with TRITC (Sigma, T0195, 1:1000) were incubated for 48 hours at 4°C). After subsequent washing, secondary antibodies were incubated for 1 hour at RT: Alexa Fluor^R 488 goat anti-rabbit (A-11034), Alexa Fluor^R 647 goat anti-chicken (A-21449), Alexa Fluor^R 568 goat anti-mouse (A-110049) (all 1:500, Invitrogen). Samples were mounted with ProLong Gold Antifade reagent with DAPI (Invitrogen, P36935).

Image acquisition and analysis

Fluorescence images were obtained using an AxioScope microscope (Zeiss) equipped with a CCD camera (16bits, 1280 x 1024pixels) and the Axiovision software (Zeiss). Quantification analysis and analysis of BT positive structures were performed using Image J Fiji software (www.imagej.nih.gov)⁴⁴. To investigate the structures forming an individual endplate, the Image J Fiji plugin “Analyze Particles” was used.

Human skeletal muscle

Muscle specimens were extracted in open biopsy of vastus lateralis (FUS3), deltoid (FUS2) and triceps (FUS1) muscles, frozen with chilled isopentane and stored at -80 °C. Serial cuts of 10 μ m thick were made with cryostat (Leica CM 3050S) and deposited on

Superfrost® slides (Superfrost, VWR, 631-0448). Slides were dried 20min then fixed with 4% PFA in 0.1mM sucrose 15min at room temperature. Sections were stained with Hematoxylin and Eosin or used for immunohistochemistry. After washing with PBS, AChR clusters were stained with TRITC-conjugated α Bungarotoxin (Sigma, T0195; 1:500) during 1h at room temperature. Sections were then permeabilized with 0.1% Triton and nonspecific binding sites were blocked with 10% goat serum and 5% FBS in PBS, 2h at room temperature. Rabbit anti-FUS (Sigma, HPA008784, 1:1000), guinea pig anti- Synaptophysin (synaptic systems, 101004, 1:500) were incubated overnight at 4°C. After rinsing in PBS and goat antirabbit Alexa Fluor 488, (Invitrogen, A-11034, 1/500) and goat anti-guinea pig Alexa Fluor 6472 (Invitrogen, A-21450) were incubated 2h at room temperature. Finally, sections were washed with PBS followed by water and mounted with ProLong Gold Antifade reagent with DAPI (Invitrogen, P36935). Confocal images were acquired with a laser scanning microscope (Leica DMI8) equipped with a ACS APO 20x, 40x or 63 x oil DIC immersion objective. Images were acquired with a resolution of 1024x1024 pixels.

Statistics

All results from analysis are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) and differences were considered significant when $p < 0.05$. Significance is presented as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. For comparison of two groups, two-tailed unpaired Student's t -test was used in combination with F-test to confirm that the variances between groups were not significantly different. Comparison for more than two groups was performed using oneway ANOVA and Tukey or Bonferroni's multiple comparison *post hoc* test. For analysis of the number of GFP+ muscle cells in MyoD-Cre>mT/mG reporter mice, the nonparametric Mann Whitney test was used, as data were not normally distributed in the control group. For human cell culture experiments, Pearson's Chi-square test (spheres data), Fisher's Exact Test (co-culture data) or two-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Bonferroni's multiple comparison test were used. Data were analyzed by using the GrapPad Prism version 6.0.

References

1. Darabid, H., Perez-Gonzalez, A.P. & Robitaille, R. Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nat Rev Neurosci* **15**, 703-718 (2014).
2. Tintignac, L.A., Brenner, H.R. & Ruegg, M.A. Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol Rev* **95**, 809-852 (2015).
3. Shi, L., Fu, A.K. & Ip, N.Y. Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci* **35**, 441-453 (2012).
4. Hippenmeyer, S., Huber, R.M., Ladle, D.R., Murphy, K. & Arber, S. ETS transcription factor Erm controls subsynaptic gene expression in skeletal muscles. *Neuron* **55**, 726-740 (2007).
5. Ravel-Chapuis, A., Vandromme, M., Thomas, J.L. & Schaeffer, L. Postsynaptic chromatin is under neural control at the neuromuscular junction. *EMBO J* **26**, 1117-1128 (2007).
6. Taylor, J.P., Brown, R.H., Jr. & Cleveland, D.W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* **539**, 197-206 (2016).
7. Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L. & Caroni, P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* **9**, 408-419 (2006).
8. Fischer, L.R., et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* **185**, 232-240 (2004).
9. Dadon-Nachum, M., Melamed, E. & Offen, D. The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci* **43**, 470-477 (2011).
10. Schwartz, J.C., Cech, T.R. & Parker, R.R. Biochemical Properties and Biological Functions of FET Proteins. *Annu Rev Biochem* **84**, 355-379 (2015).
11. Ling, S.C., Polymenidou, M. & Cleveland, D.W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* **79**, 416-438 (2013).
12. Deng, H., Gao, K. & Jankovic, J. The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology* **10**, 337-348 (2014).
13. Dormann, D., et al. ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J* **29**, 2841-2857 (2010).
14. Scekic-Zahirovic, J., et al. Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J* **35**, 1077-1097 (2016).
15. Scekic-Zahirovic, J., et al. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* **133**, 887-906 (2017).
16. Kanisicak, O., Mendez, J.J., Yamamoto, S., Yamamoto, M. & Goldhamer, D.J. Progenitors of skeletal muscle satellite cells express the muscle determination gene, MyoD. *Dev Biol* **332**, 131-141 (2009).
17. Yamamoto, M., et al. A multifunctional reporter mouse line for Cre- and FLP-dependent lineage analysis. *Genesis* **47**, 107-114 (2009).
18. Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. & Luo, L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* **45**, 593-605 (2007).
19. Angus, L.M., et al. Calcineurin-NFAT signaling, together with GABP and peroxisome PGC1{alpha}, drives utrophin gene expression at the neuromuscular junction. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C908-917 (2005).
20. Handschin, C., et al. PGC-1alpha regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. *Genes Dev* **21**, 770-783 (2007).
21. Tan, A.Y., Riley, T.R., Coady, T., Bussemaker, H.J. & Manley, J.L. TLS/FUS (translocated in liposarcoma/fused in sarcoma) regulates target gene transcription via single-stranded DNA response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6030-6035 (2012).
22. Kedage, V., et al. An Interaction with Ewing's Sarcoma Breakpoint Protein EWS Defines a Specific Oncogenic Mechanism of ETS Factors Rearranged in Prostate Cancer. *Cell Rep* **17**, 12891301 (2016).

23. Higelin, J., *et al.* FUS Mislocalization and Vulnerability to DNA Damage in ALS Patients Derived hiPSCs and Aging Motoneurons. *Front Cell Neurosci* **10**, 290 (2016).
24. Hosoyama, T., McGivern, J.V., Van Dyke, J.M., Ebert, A.D. & Suzuki, M. Derivation of myogenic progenitors directly from human pluripotent stem cells using a sphere-based culture. *Stem Cells Transl Med* **3**, 564-574 (2014).
25. Demestre, M., *et al.* Formation and characterisation of neuromuscular junctions between hiPSC derived motoneurons and myotubes. *Stem Cell Res* **15**, 328-336 (2015).
26. Baumer, D., *et al.* Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations. *Neurology* **75**, 611-618 (2010).
27. Waibel, S., *et al.* Truncating mutations in FUS/TLS give rise to a more aggressive ALS phenotype than missense mutations: a clinico-genetic study in Germany. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **20**, 540-546 (2013).
28. Zou, Z.Y., Liu, M.S., Li, X.G. & Cui, L.Y. Mutations in FUS are the most frequent genetic cause in juvenile sporadic ALS patients of Chinese origin. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **17**, 249-252 (2016).
29. So, E., *et al.* Mitochondrial abnormalities and disruption of the neuromuscular junction precede the clinical phenotype and motor neuron loss in hFUSWT transgenic mice. *Hum Mol Genet* **27**, 463-474 (2018).
30. Sharma, A., *et al.* ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nature communications* **7**, 10465 (2016).
31. Miller, T.M., *et al.* Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cellautonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1954619551 (2006).
32. Towne, C., Raoul, C., Schneider, B.L. & Aebischer, P. Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Mol Ther* **16**, 1018-1025 (2008).
33. Dobrowolny, G., *et al.* Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab* **8**, 425-436 (2008).
34. Wong, M. & Martin, L.J. Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet* **19**, 2284-2302 (2010).
35. Williams, A.H., *et al.* MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* **326**, 1549-1554 (2009).
36. Vandesompele, J., *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034 (2002).
37. Aasen, T., *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* **26**, 1276-1284 (2008).
38. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
39. Warlich, E., *et al.* Lentiviral vector design and imaging approaches to visualize the early stages of cellular reprogramming. *Mol Ther* **19**, 782-789 (2011).
40. Stockmann, M., *et al.* Developmental and functional nature of human iPSC derived motoneurons. *Stem Cell Rev* **9**, 475-492 (2013).
41. Linta, L., *et al.* Rat embryonic fibroblasts improve reprogramming of human keratinocytes into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* **21**, 965-976 (2012).
42. Hu, B.Y. & Zhang, S.C. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* **4**, 1295-1304 (2009).
43. Darabi, R., *et al.* Human ES- and iPSC-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell* **10**, 610-619 (2012).
44. Schindelin, J., *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682 (2012).

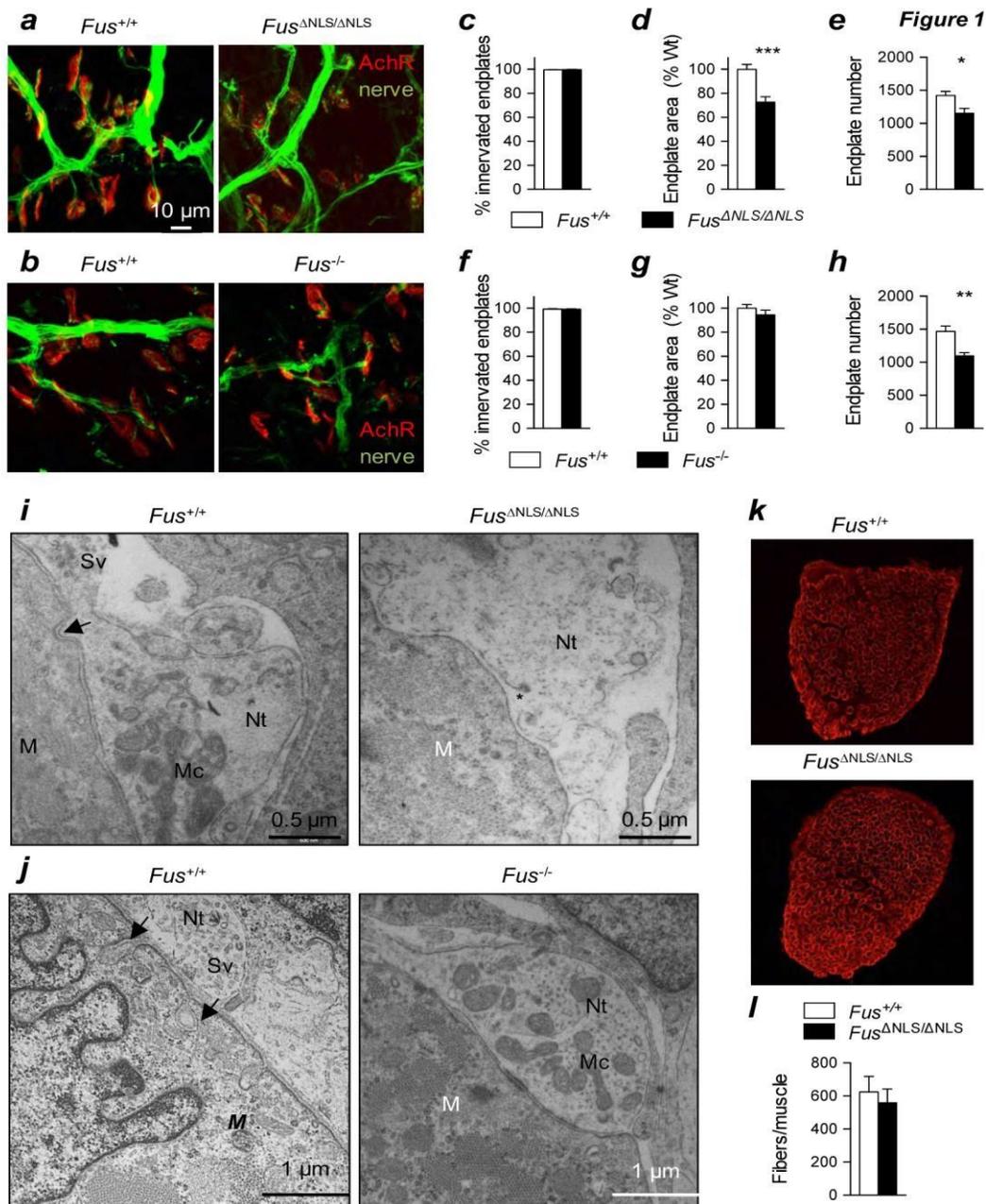


Figure 1: Neuromuscular junction (NMJ) defects in newborn *Fus* mutant mice. **a, b**, Representative images showing NMJs in tibialis anterior muscles of newborn *Fus*^{+/+} versus *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} (a) and *Fus*^{+/+} versus *Fus*^{-/-} mice (b). Axons and presynaptic terminals were visualized by immunostaining with antibodies against neurofilament and SV2 (green). AChRs in muscle endplates were visualized using fluorescently labeled BTX (red). Scale bar: 10μm. **c-h**, Bar graphs showing the percentage (%) of innervated endplates (c, f), the average endplate area (as % of Wt) (d, g) and the total number of endplates (e, h) in the tibialis anterior muscle of newborn *Fus*^{+/+} versus *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} (c-e) and *Fus*^{+/+} versus *Fus*^{-/-} mice (f-h). Average ± SEM; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001; N=12-13 (c); 16-15 (d); 11 (e); 8 (f), 8 (g); 8 (h). **i, j**, TEM images of NMJs in E18.5 gastrocnemius muscle of *Fus*^{+/+} versus *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} (i) and *Fus*^{+/+} versus *Fus*^{-/-} (j) mice. Nt: nerve terminal; M: muscle; Mc: mitochondria; Sv: synaptic vesicles. Scale bar: 0.5μm (i) and 1μm (j). **k**, Dystrophin staining to visualize individual muscle fibers in extensor digitorum longus (EDL) muscle of newborn *Fus*^{+/+} versus *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} mice. **l**, Bar graph showing the total number of muscle fibers in EDL muscle of newborn *Fus*^{+/+} versus *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} mice. Average ± SEM; N=5-4.

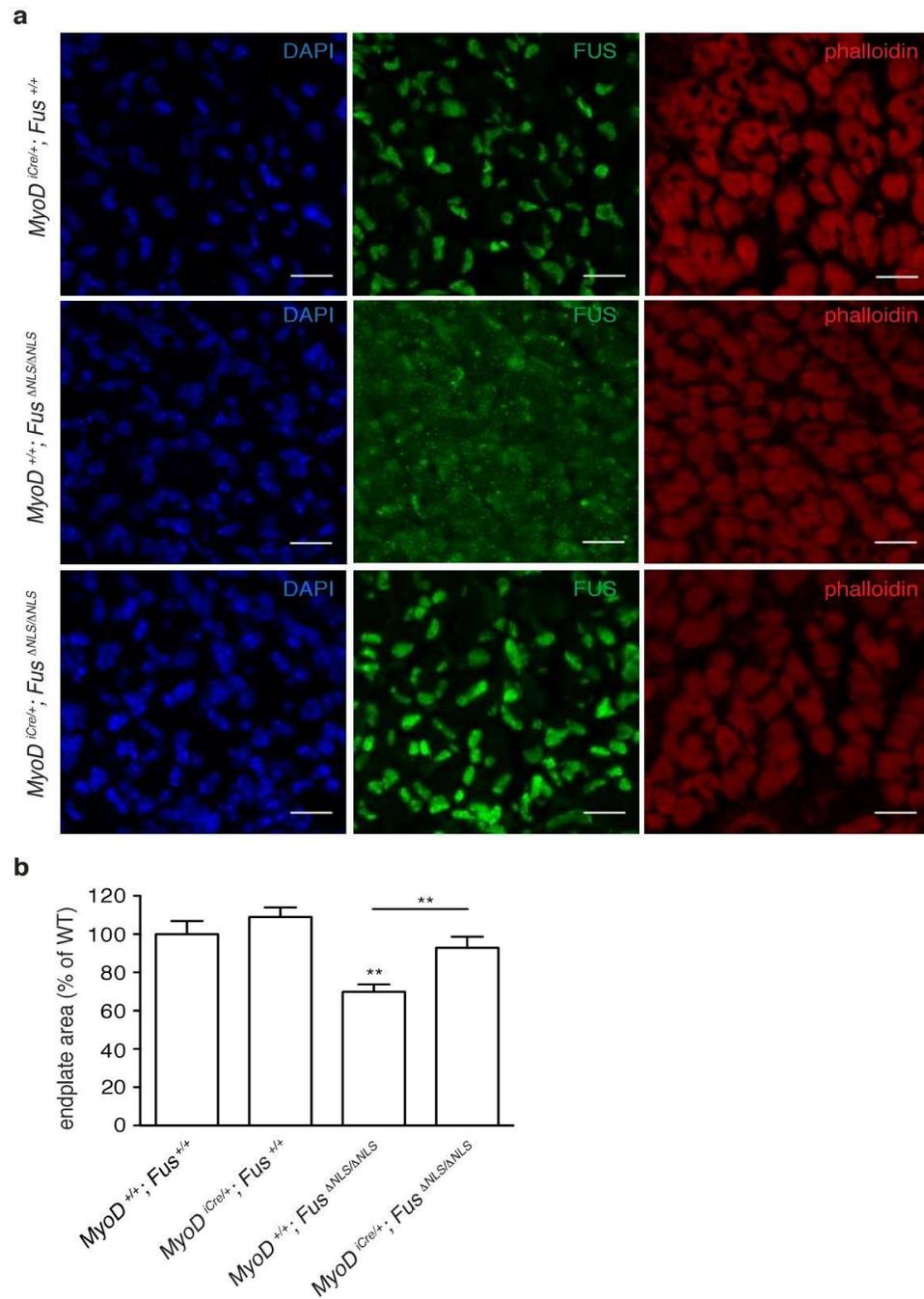


Figure 2: Cytoplasmic mislocalized $Fus^{\Delta NLS}$ protein is intrinsically toxic to muscle. **a**, immunostaining of FUS in the tibialis anterior of newborn $MyoD^{iCre/+}; Fus^{+/+}$ (upper row), $MyoD^{+/+}; Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ (middle row), and $MyoD^{iCre/+}; Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ (lower row) mice. Nuclei were labeled with DAPI and myofibers with the filamentous actin probe phalloidin. Merged images are shown in the right column. **b**, Endplate surface area as % of wild type littermate controls in tibialis anterior of newborn offspring from $MyoD^{iCre/+}; Fus^{\Delta NLS/+}$ x $Fus^{\Delta NLS/+}$ crosses. N=8-14; **p<0.01 by one way ANOVA.

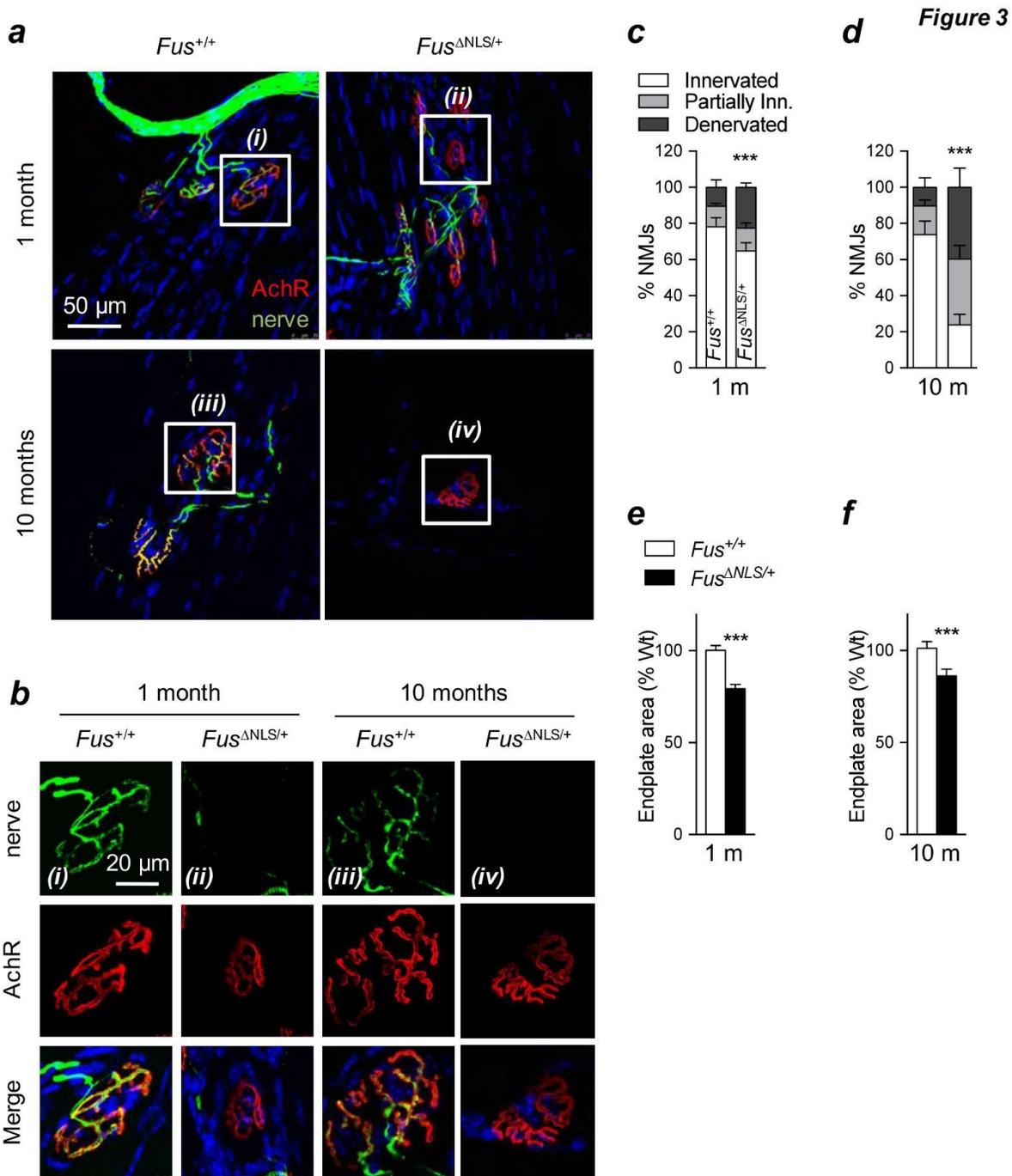


Figure 3: Neuromuscular junction (NMJ) defects in heterozygous *Fus*^{ΔNLS/+} mice. **a, b**, Representative images showing NMJs in tibialis anterior muscles of 1 month old (upper panel) and 10 months old (lower panels) *Fus*^{+/+} versus *Fus*^{ΔNLS/+} mice. Panel b shows magnifications of individual NMJs (i to iv) delineated in panel a. Axons and presynaptic terminals were visualized by immunostaining with antibodies against neurofilament and synaptophysin (green). AChRs in muscle endplates were visualized using fluorescently labeled BTX (red). Scale bars: 50μm (a), 20μm (b). **c-f**, Bar graphs showing the percentage (%) of innervated, partially denervated and fully denervated endplates (c, d), and the average endplate area (as % of Wt) (e, f) in the tibialis anterior muscle of 1 month old (c, e) and 10 months old (d, f) *Fus*^{+/+} versus *Fus*^{ΔNLS/+} mice.

Figure 4

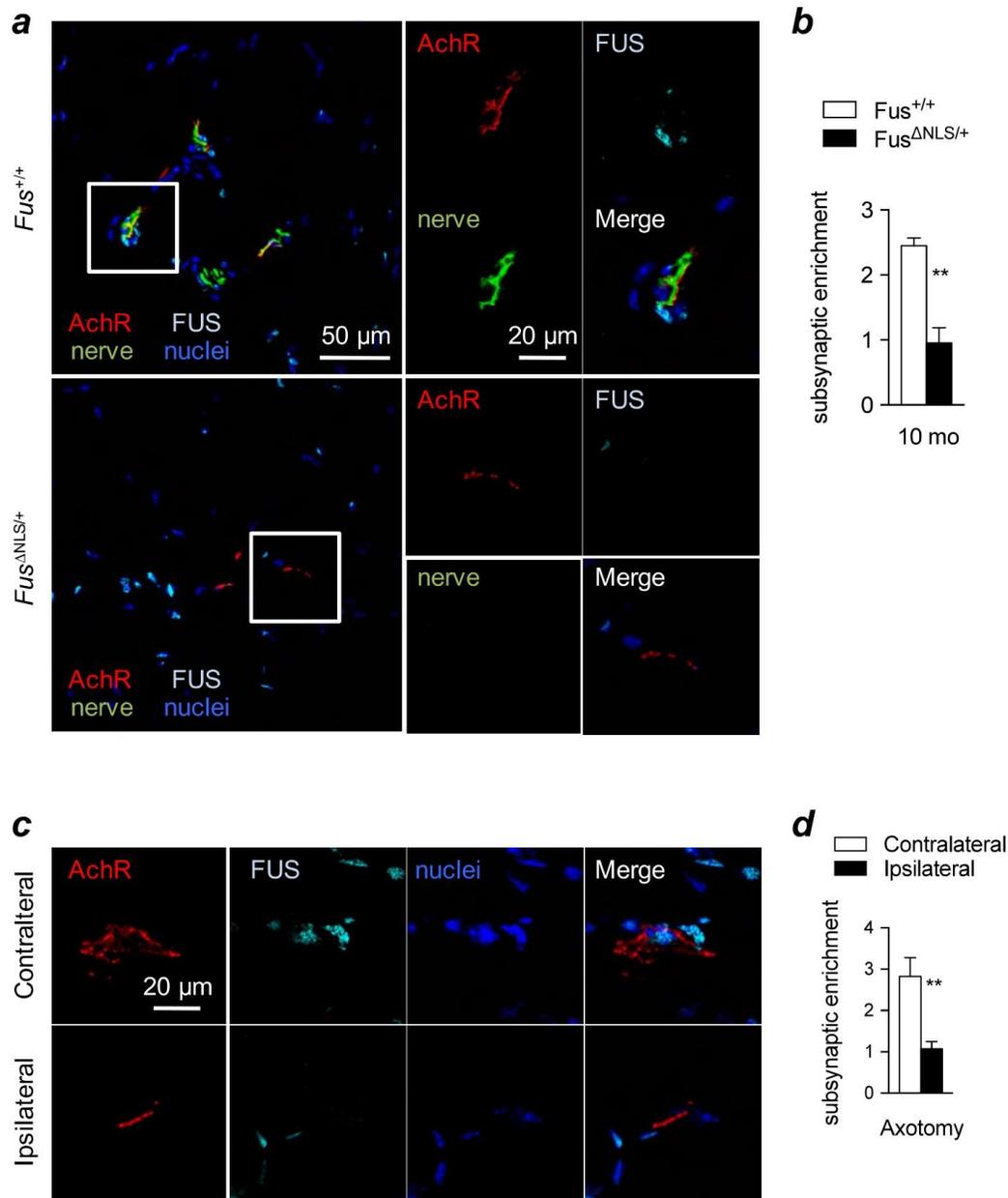


Figure 4: Innervation-dependent enrichment of FUS in subsynaptic nuclei. **a**, Representative images showing FUS immunoreactivity (cyan) in the gastrocnemius muscle of 10 months old *Fus*^{+/+} versus *Fus* ^{Δ NLS/+} mice. Axons and presynaptic terminals were visualized immunostaining of neurofilament and synaptophysin (green). AChRs in muscle endplates were visualized using fluorescently labeled BTX (red). **b**, Relative enrichment of FUS immunoreactivity in subsynaptic versus nonsynaptic nuclei in gastrocnemius muscle of 10 months old *Fus*^{+/+} versus *Fus* ^{Δ NLS/+} mice. Subsynaptic nuclei were defined as nuclei apposed to BTX-positive endplates. **c**, Representative images showing FUS immunoreactivity (cyan) in the contralateral (upper panels) or ipsilateral (lower panels) gastrocnemius muscle of mice, 5 days after sciatic nerve axotomy. **d**, Quantification of subsynaptic enrichment of FUS in ipsilateral and contralateral gastrocnemius.

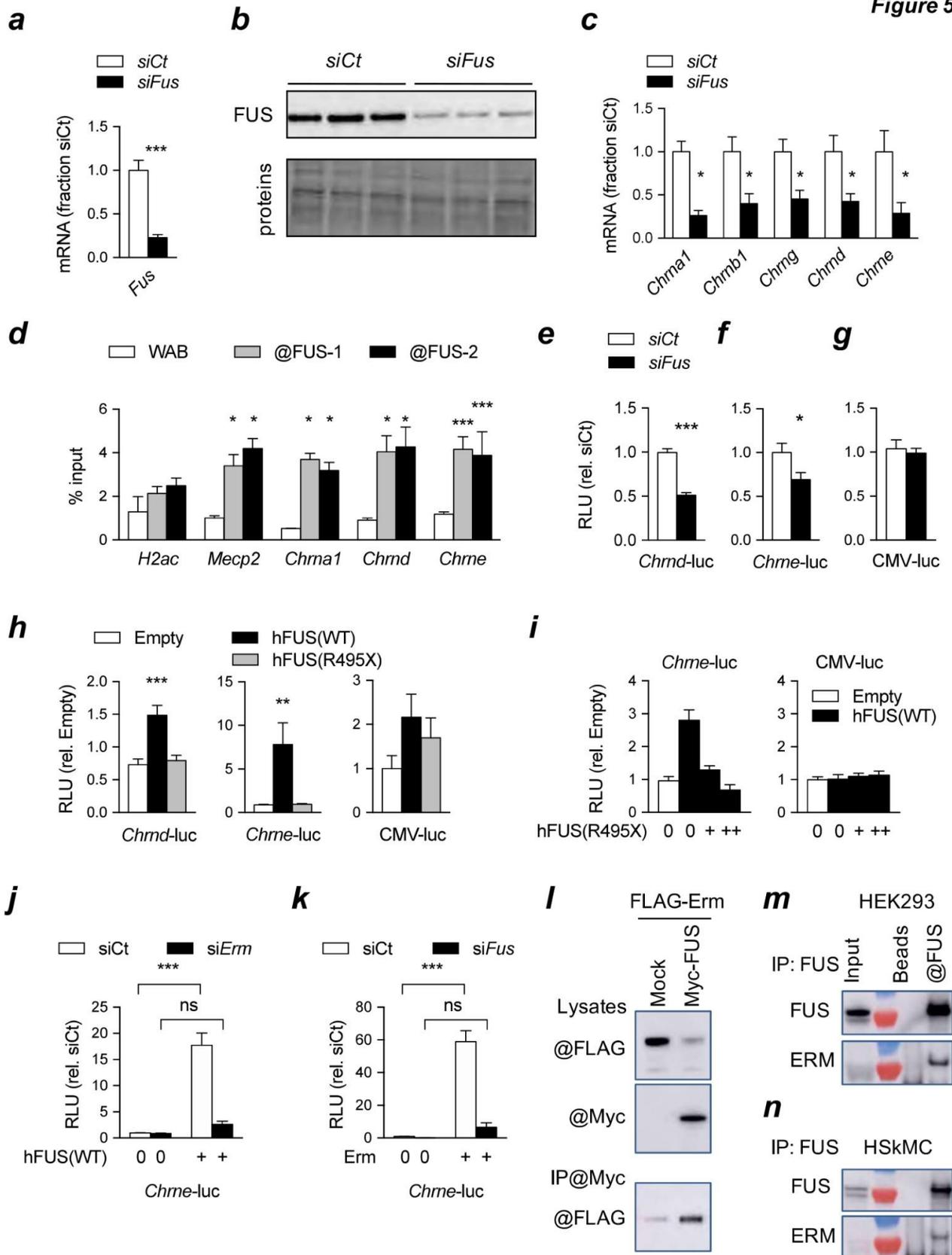


Figure 5: FUS regulates subsynaptic expression of AChR subunit genes. **a, b,** *Fus* mRNA (a) and protein (b) levels in C2C12 cells 48 hours after transfection with control siRNA (*siCt*, 100 nM) or siRNA targeting *Fus* (*siFus*, 100 nM). In b, the lower panel shows the total protein stain of the corresponding western blot to demonstrate equal loading. In panel a, average \pm SEM is shown; *** p <0.001; N= 3 **c,** Relative mRNA levels of genes encoding acetylcholine receptor subunits, including *Chrna1*, *Chrn1*, *Chrng*, *Chrnd*, and *Chrne*, in C2C12 cells 48 hours after transfection with *siCt* (100 nM) or *siFus* (100 nM). Average \pm SEM; N=3 independent experiments; * p <0.05 **d,** Fraction of chromatin immunoprecipitated (% input) with buffer (WAB), or with two different anti-FUS antibodies (@FUS-1 and @FUS-2). Chromatin was detected using qPCR with primers located in the promoter regions of *H2ac*, *Mecp2*, *Chrna1*, *Chrnd*, and *Chrne* genes. Average \pm SEM; N= 3 independent experiments; * p <0.05, *** p <0.001. **e-g,** Luminescence intensity (in relative lights units (RLU), shown as fraction of *siCt*) measured in C2C12 cells 24 hours after transfection with *siCt* (25 nM) or *siFus* (25 nM) and luciferase reporter plasmids carrying promoters of *Chrnd* (e), *Chrne* (f) genes or CMV (g). Average \pm SEM; N= 4 independent experiments; * p <0.05, *** p <0.001; **h,** Luminescence intensity (in RLU) measured in C2C12 cells transfected with luciferase reporter plasmids for promoters of *Chrnd* (left), *Chrne* (middle) or CMV (right), and plasmids expressing hFUS(WT), hFUS(R495X) or empty control plasmid. Data are shown as a fraction of the empty control plasmid. Average \pm SEM; N=3-5 independent experiments; ** p <0.01, *** p <0.001. **i,** Luminescence intensity (in RLU) measured in C2C12 cells transfected with luciferase reporter plasmids for promoters of *Chrne* (left) or CMV (right), and a plasmids expressing hFUS(WT) in the presence of increasing doses of hFUS(R495X). Transfection of empty plasmid was used as control, and data are shown as a fraction of the empty control plasmid. Average \pm SEM; N= 5 independent experiments **j,** Luminescence intensity (in RLU) measured in C2C12 cells 24h after transfection with *siCt* (25nM) or *siErm* (25nM), a luciferase reporter plasmid carrying the promoter of the *Chrne* gene, and a plasmid expressing hFUS(WT) or empty control plasmid. Data are shown as fraction of *siCt* with empty control plasmid. Average \pm SEM; N= 4 independent experiments; *** p <0.001, ns: not significant. **k,** Luminescence intensity (in RLU) measured in C2C12 cells 24h after transfection with *siCt* (25nM) or *siFus* (25nM), a luciferase reporter plasmid carrying the promoter of the *Chrne* gene, and a plasmid expressing *Erm* or empty control plasmid. Data are shown as fraction of *siCt* with empty control plasmid. Average \pm SEM; N=3 independent experiments; *** p <0.001, ns: not significant. **l,** Expression of FLAGERM and Myc-Fus after HEK293 transfection was confirmed in cellular extracts (lysates) with either the anti-FLAG or the anti-Myc antibody. Proteins were immunoprecipitated with anti-Myc (IP) and each sample was subsequently immunoblotted with anti-Flag antibody. **m, n,** The interaction of endogenous FUS and ERM was tested in HEK293 cells (m) and HSkMC cells (n). Endogenous FUS was immunoprecipitated with its specific antibody (IP) and immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-FUS or anti-ERM antibody.

a

Cell line	mutation
CNTL1	-
CNTL2	-
CNTL3	corrected mutation FUS1 R495QfsX527 (c.1483InsC)
FUS1	R495QfsX527 (c.1483delC), frameshift
FUS2	D502Tfs*27 (c.1504delG), frameshift

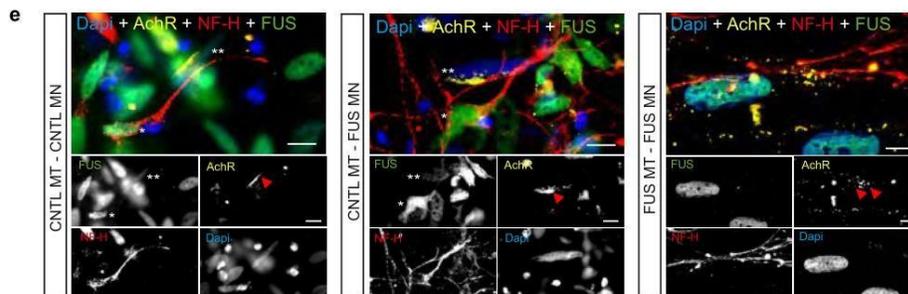
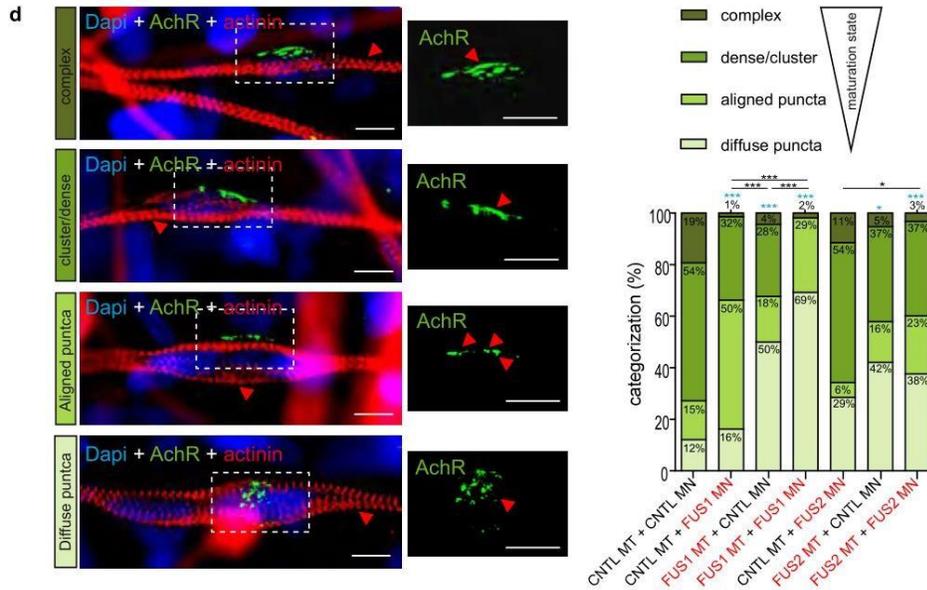
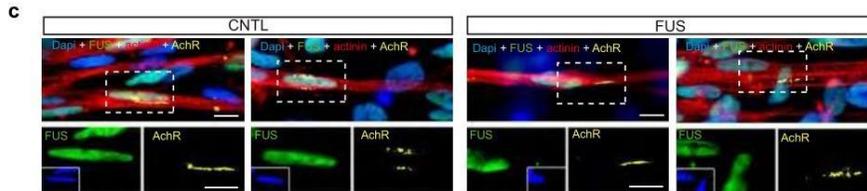
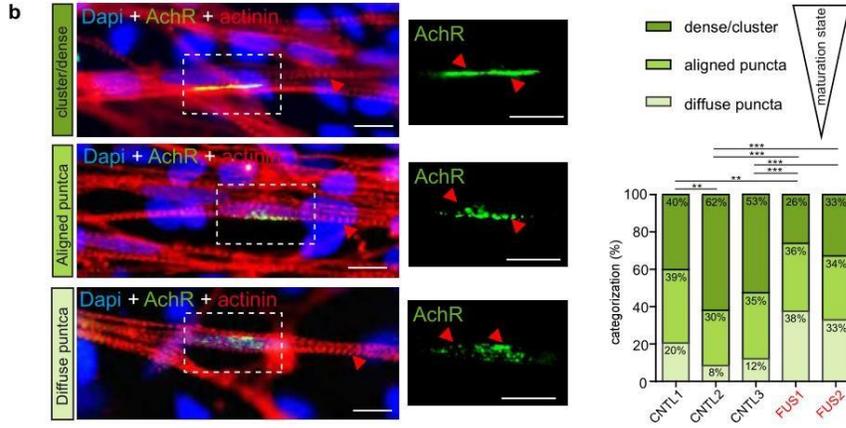


Figure 6: Maturity of AchR clusters is impaired in human myotubes derived from *FUS*-ALS patients. **a**, Table listing hiPS cell lines with respective *FUS* mutations used in this study. In addition to two healthy control cell lines (CNTL1 and 2), one isogenic control cell line was generated via CRISPR/Cas9 technology (CNTL 3). Two different *FUS* mutations (*FUS*1 and 2), both frameshift mutations, were analyzed. **b**, Structures of acetylcholine receptor (AChR) clusters on hiPSC-derived myotubes were visualized with BTX (green) and assorted based on their morphology in three categories with increasing maturity. Myotubes were immunolabeled with actinin (red) and nuclei with Dapi (blue). Quantification of maturation state (diffuse puncta, aligned puncta, dense/cluster) is shown in the bar graph, revealing less mature endplate-like structures in both patient-derived cell lines compared to all controls. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Pearson's Chi-squared test to compare distribution patterns. Scale bar: 10 μ m. **c**, hiPSC-derived myotubes were labeled with BTX (yellow), *FUS* (green), actinin (red) and Dapi (blue). *FUS* predominantly localized to nuclei in both CNTL and *FUS* myotubes. Scale bar: 10 μ m. **d**, Structures of AChR clusters in hiPSC-derived motor neuron-myotube co-cultures were visualized with BTX (green) and assorted based on their morphology in four categories with increasing maturity. Myotubes were immunolabeled with actinin (red) and nuclei with Dapi (blue). Quantification of maturation state (diffuse puncta, aligned puncta, dense/cluster or complex) is shown in the bar graph, revealing less mature endplate-like structures in co-cultures in which myotubes and/or motor neurons were derived from *FUS*ALS patients. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; Fisher's Exact Test for Count Data. Scale bar: 10 μ m. **e**, Motor neuron-myotube co-cultures were labeled for *FUS* (green), AChR (BTX, yellow), neurofilament heavy chain (NF-H, red, labels axons) and Dapi (blue). *FUS* localized to nuclei of both CNTL and *FUS* myotubes (**), but in *FUS*-mutant motor neurons, *FUS* localized to both nucleus and cytoplasm (*). Scale bar 10 μ m.

a	biopsy	amino acid change	clinical/(age) onset
	CNTL	-	
	FUS1	R495QfsX527 (c.1483delC), frameshift	spinal (26)
	FUS2	K105R	spinal (24)
	FUS3	not determined	bulbar (39)

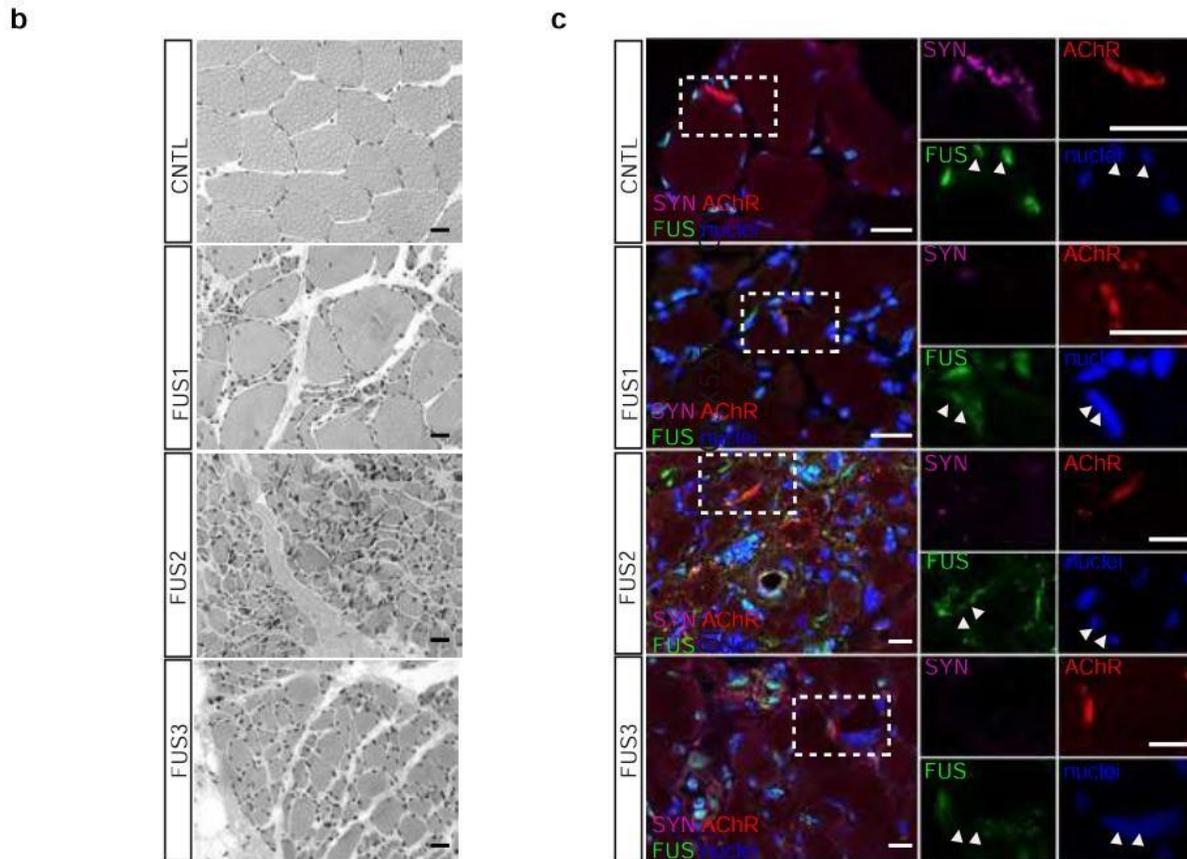
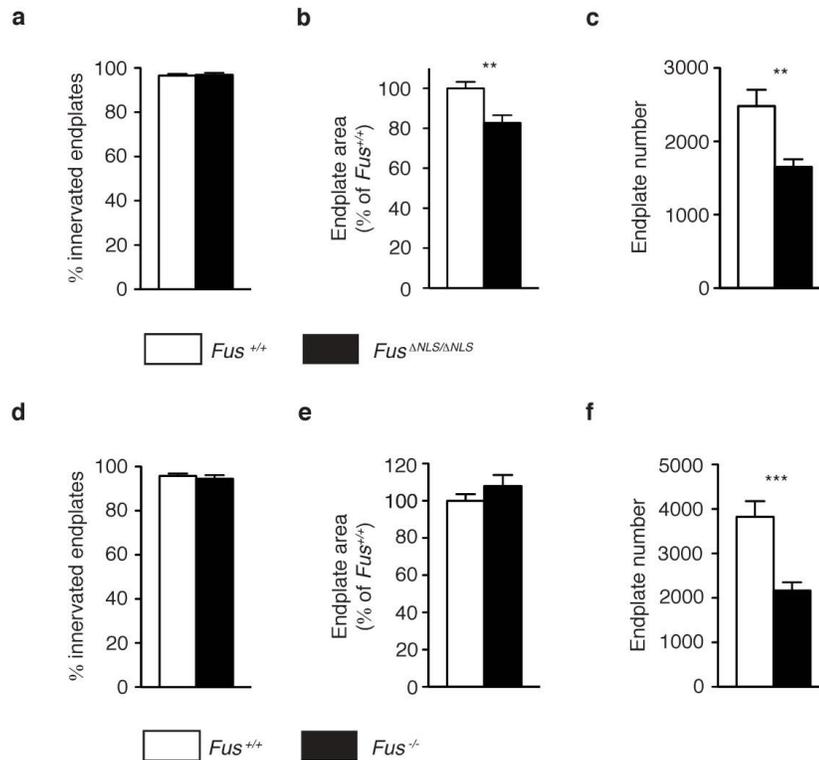
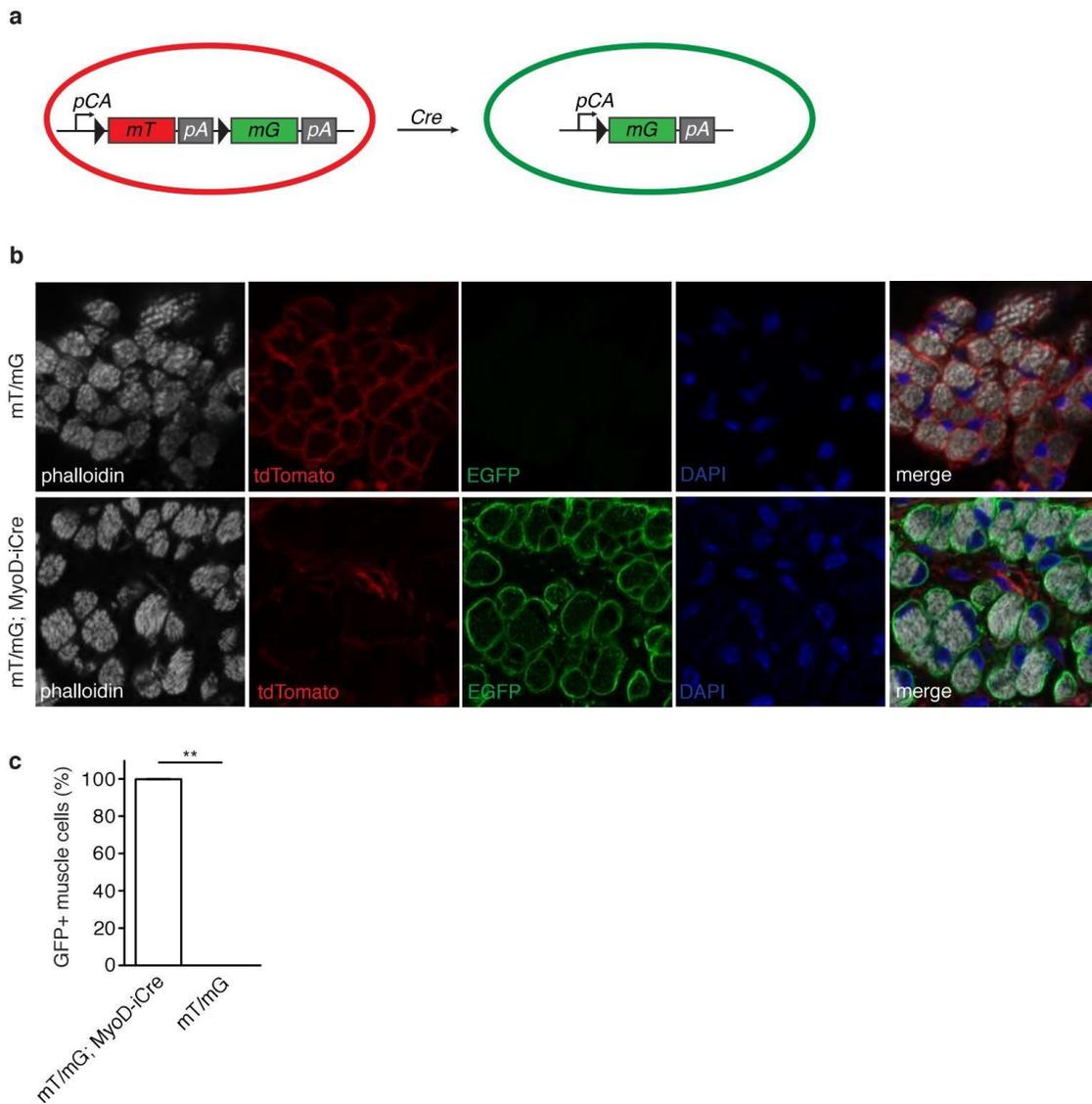


Figure 7: Skeletal muscle of *FUS*-ALS patients displays muscle atrophy, smaller and denervated NMJs and *FUS* mislocalization. **a**, Table listing the four human skeletal muscle biopsies, including *FUS* mutation, site of onset (spinal or bulbar) and age of onset. **b**, H&E staining on muscle biopsies revealed muscle atrophy in *FUS*-ALS patients, with angular and shrunken myofibers, increased density of nuclei and connective tissue. **c**, Staining of skeletal muscle biopsies for *FUS* (green), synaptophysin (SYN, magenta, labels presynaptic terminals), AchR (BTX, red) and Dapi (blue). Scale Bar: 20 μ m.

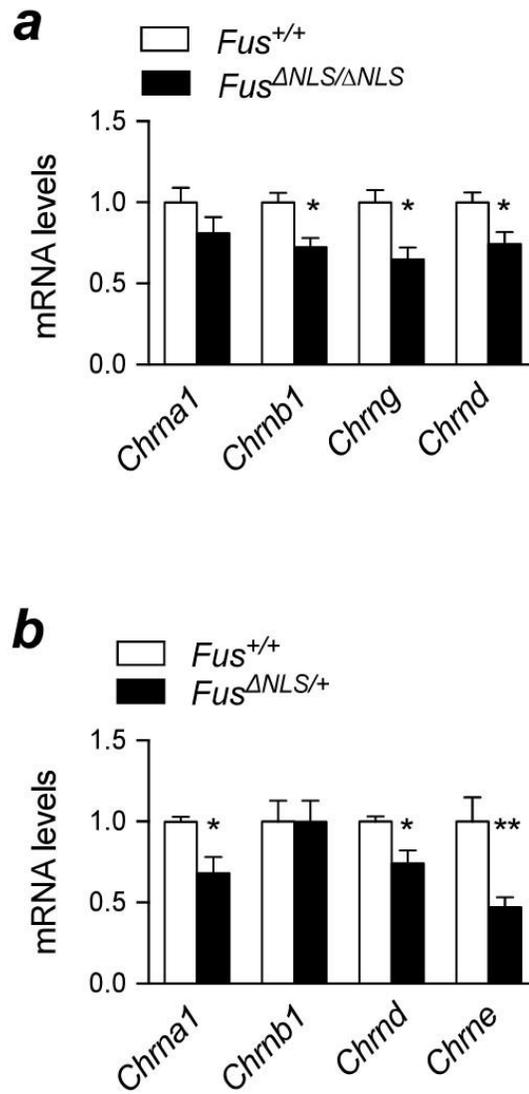
Supplementary figure legends



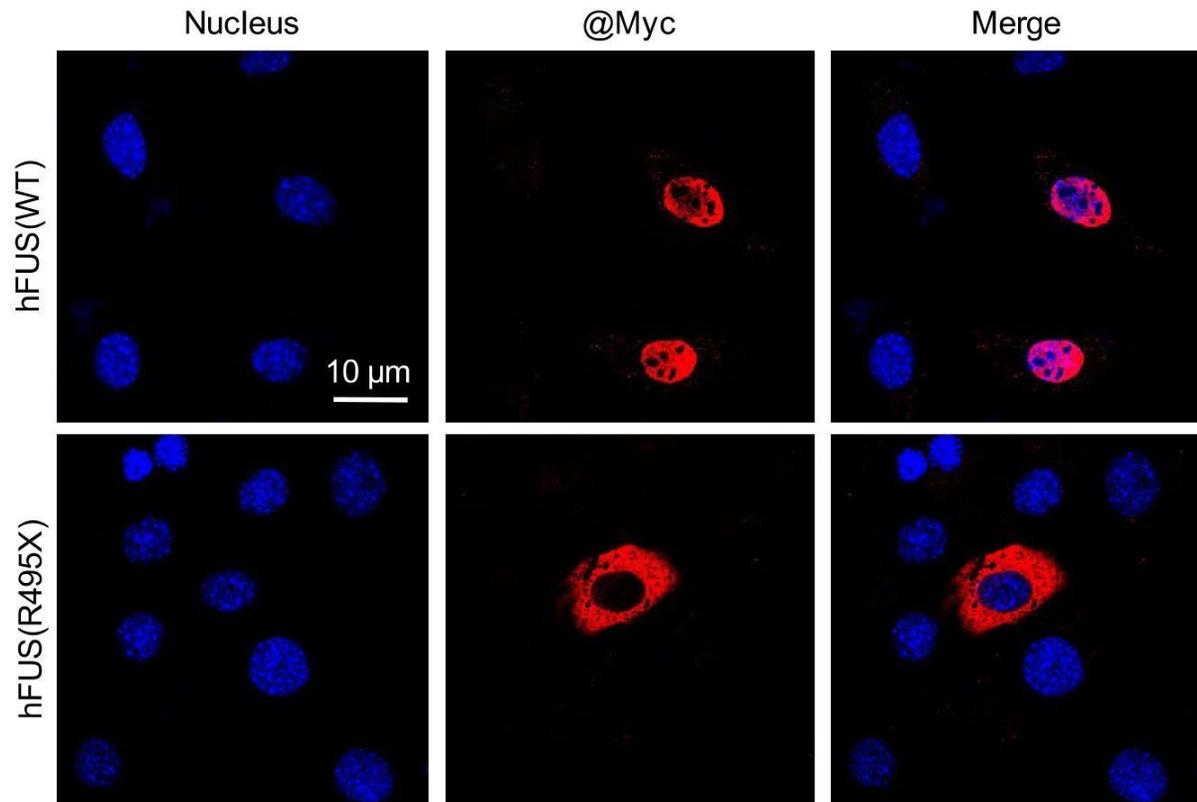
Supplementary figure 1: NMJ morphology defects in the gastrocnemius of newborn $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ and $Fus^{-/-}$ mice. Bar graphs showing the percentage (%) of innervated endplates (a, d), endplate surface area as % of $Fus^{+/+}$ littermate controls (b, e) and the total number of endplates in the gastrocnemius (c, f) of newborn $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ (a-c) and $Fus^{-/-}$ (d-f) mice. N=11-12 (a); 14-16 (b); 4-5 (c); 8 (d); 13-15 (e); 78 (f). **p<0.01, ***p<0.001 by two-tailed unpaired t-test.



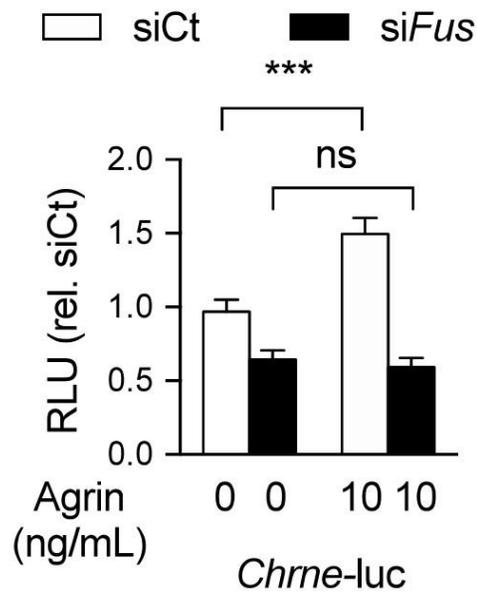
Supplementary figure 2: MyoD^{iCre} mediates highly efficient recombination between LoxP sites. **a**, Schematic illustrating the working principle of the ROSA^{MT/mG} reporter mice. The chicken β -actin core promoter with a CMV enhancer (pCA) drives expression of the loxP-flanked (triangles) coding sequence of membrane-targeted tandem dimer Tomato (mT). After Cre-mediated excision of the mT sequence, the pCA promoter drives expression of membrane-targeted EGFP (mG). pA: polyadenylation sequence. **b**, Transverse sections through the tibialis anterior of adult ROSA^{MT/mG}/+ (control, upper panels) and MyoD^{iCre/+}; ROSA^{MT/mG}/+ (experimental, lower panels) mice were labeled with phalloidin (to visualize muscle fibers), antibodies against tdTomato and GFP, and DAPI. **c**, Bar graph showing the percentage (%) or GFP-positive muscle fibers in MyoD^{iCre/+}; ROSA^{MT/mG}/+ and ROSA^{MT/mG}/+ mice. N=6; p=0.0025 by Mann Whitney test.



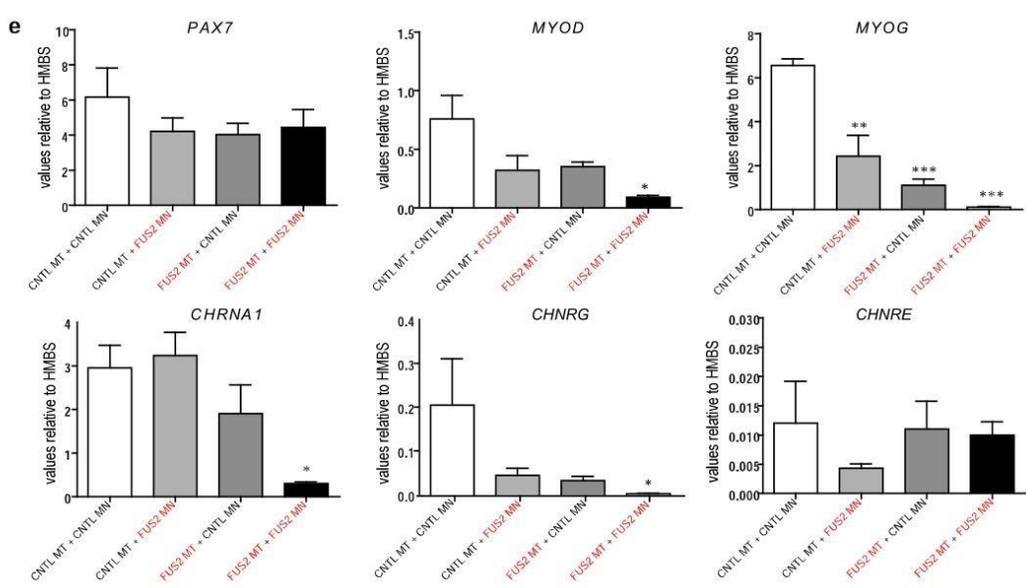
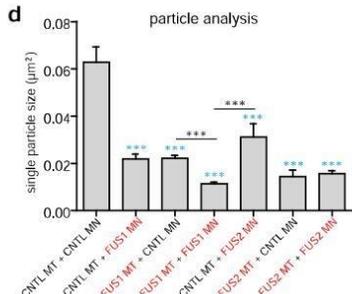
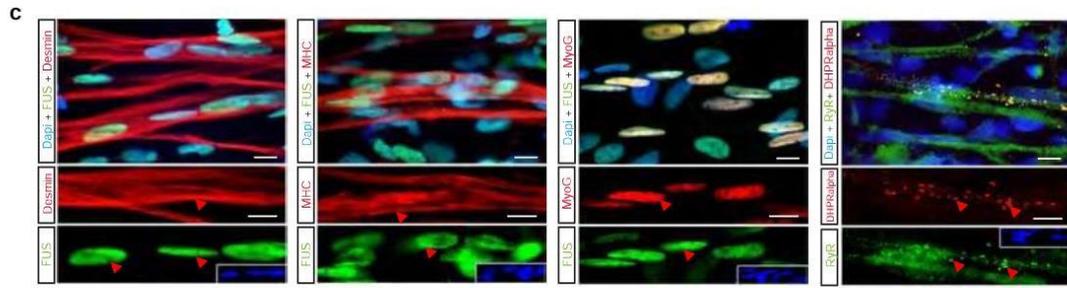
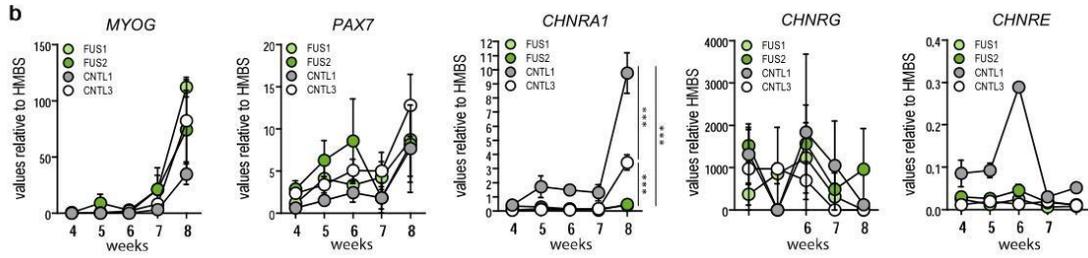
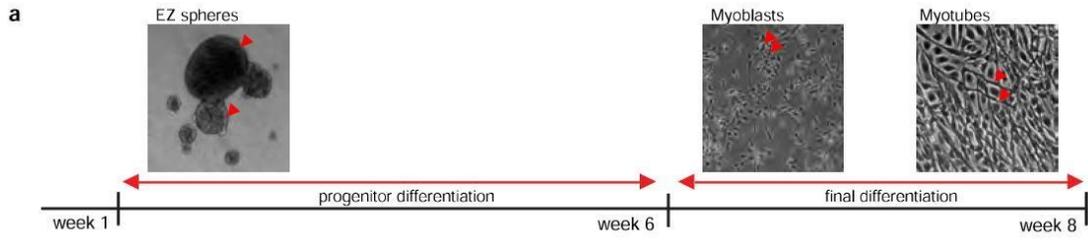
Supplementary Figure 3: Reduced expression of AChR subunit genes in *Fus*-ALS mouse models. **a, b,** Relative mRNA levels of AChR subunit genes, including *Chrna1*, *Chrb1*, *Chrng*, *Chrnd*, and *Chrne*, in gastrocnemius muscle of E18.5 *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} mice (a) and tibialis anterior muscle of 1 month old *Fus*^{ΔNLS/+} mice (b). Note that *Chrne* is not expressed at E18.5, and *Chrng* is not expressed at 1 month of age.



Supplementary Figure 4: Cytoplasmic mislocalization of R495X mutant FUS in C2C12 cells. Representative images showing immunostaining of C2C12 cells transfected with plasmids expressing Myc-tagged WT or R495X human FUS using antibodies against FUS and Myc.



Supplementary Figure 5: FUS is required for Agrin induced transcriptional activation of *Chrne* promoter. Luminescence intensity (in RLU) measured in C2C12 cells 24 hours after transfection with *siCt* (25 nM) or *siFus* (25 nM) and luciferase reporter plasmid carrying the promoter of *Chrne* gene, and further treated for 24 hours with agrin (10 ng/mL) or its vehicle. Data are shown as a fraction of siCt. Average \pm SEM; N=4 independent experiments; *** p <0.001, ns: not significant.



Supplementary Figure 6: Characterization of hiPSC-derived myotubes. **a**, Time course of the spheresbased protocol for myogenic differentiation, including progenitor and final myotube differentiation steps. **b**, Relative mRNA levels of *MYOG*, *PAX7*, *CHRNA1*, *CHRNA1* and *CHRNE* as determined by quantitative real time PCR (qPCR) on hiPSC-derived myocytes from two control and two *FUS*-ALS patients at different time points during differentiation (4, 5, 6, 7 and 8 weeks). The *HMBS* gene (encoding hydroxymethylbilane synthase) was used as housekeeping gene for normalization. Transcript levels of AChR subunit gene *CHNRA1* were significantly reduced in *FUS*-ALS myotubes after 8 weeks of differentiation. N=3; ***p<0.001 by two-way ANOVA with Bonferroni post-test (n=3). **c**, Differentiated muscle cells stained positive for desmin, myosin heavy chain (MHC), MyoG, ryanodine receptor isoform RyR1 and voltage-dependent dihydropyridine receptor alpha subunit (DHPRalpha). Staining for FUS and Dapi revealed FUS localization of nuclei. **d**, Average size of single BTX positive puncta within endplates in motor neuron-myotube co-cultures. Compared to CNTL-CNTL co-cultures, any combination containing *FUS*-ALS neurons or myotubes showed reduced single particle size. ***p<0.001 by two-way ANOVA with Bonferroni post-test. **e**, Relative mRNA levels of myogenic differentiation markers and AChR subunits in motor neuron-myotube co-cultures as determined by qPCR. The *HMBS* gene was used as housekeeping gene for normalization. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 by two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

II. Publication n°2 : Rôle de FUS dans le muscle (en préparation)

Les mutations dans les RBP, incluant FUS et TDP-43, sont à l'origine de maladies neurologiques et musculaires comme la SLA, la myosite à inclusion avec démence et maladie de Paget (mutation de hnRNPA2 et hnRNPA1) ou des maladies purement musculaires comme des myopathies distales (mutation de matrin 3) (Kim et al 2013, Senderek et al 2009). Bien que l'importance des RBP ait été reconnue, leur mécanisme d'action dans le muscle a été étudié de façon incomplète.

Précédemment, nous avons identifié un rôle de FUS dans l'expression synaptique des AchR grâce à son interaction avec ERM dans les noyaux sous-synaptiques.

Je me suis ensuite penchés sur le rôle de FUS dans le muscle, au-delà de la JNM. Suite au séquençage de l'ARN de muscle gastrocnémien de souris *Fus*^{ΔNLS} et *Fus* KO à la naissance, les analyses bio-informatiques réalisées en collaboration avec Clotilde Lagier-Tourenne ont révélées que FUS est requise pour l'expression des gènes mitochondriaux. De plus, un fort enrichissement en site de liaison de MEF2A a été observé parmi les gènes dont l'expression est dérégulée.

En adéquation avec ces résultats, la microscopie électronique effectuée sur le muscle gastrocnémien de souris *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} et *Fus*^{-/-} à la naissance a mis en évidence une dégénérescence mitochondriale et des anomalies dans la structure du muscle. Une désorganisation des myofibrilles et une altération du réticulum sarcoplasmique a été observée. Chez les adultes *Fus*^{ΔNLS/+}, j'ai confirmé l'altération mitochondriale par microscopie électronique et grâce à des marquages de l'activité mitochondriale des enzymes cytochrome oxydase (COX) et succinate déshydrogénase (SDH).

De manière cohérente, le knock-down de FUS dans les cellules C2C12 provoque la baisse d'expression des gènes cibles de MEF2A, identifiés dans le RNAseq et des gènes mitochondriaux.

De façon très intéressante, PRMT1, une méthyltransférase impliquée dans la myogenèse et la fonction mitochondriale, a été identifiée comme partenaire de liaison de FUS. J'ai alors émis l'hypothèse que PRMT1 interagit avec FUS et MEF2A pour réguler les fonctions musculaires. In vitro, j'ai montré qu'un inhibiteur des méthyltransférases diminue l'activation de MEF2A induite

par FUS. Par la suite, nous avons montré, à l'aide de knock-down de PRMT1, que FUS est requise pour l'activité de MEF2A, et que cette activité dépendait de PRMT1.

Ces données suggèrent que FUS est requise pour l'activité mitochondriale musculaire et pour l'activité transcriptionnelle de MEF2A via PRMT1.

Un candidat potentiel intervenant dans ce mécanisme pourrait être PGC1 α , une protéine mitochondriale impliquée dans la programmation du type de fibre musculaire. En effet, PGC1 α interagit avec FUS (Sanchez-Ramos et al 2011) et avec la famille Mef2 (Czubryt et al 2003). De plus, PRMT1 contribue à l'activité de PGC1 α et de ses fonctions mitochondriales (Teyssier et al 2005). Les relations potentielles entre FUS, MEF2A, PRMT1 et PGC1 α restent donc à étudier.

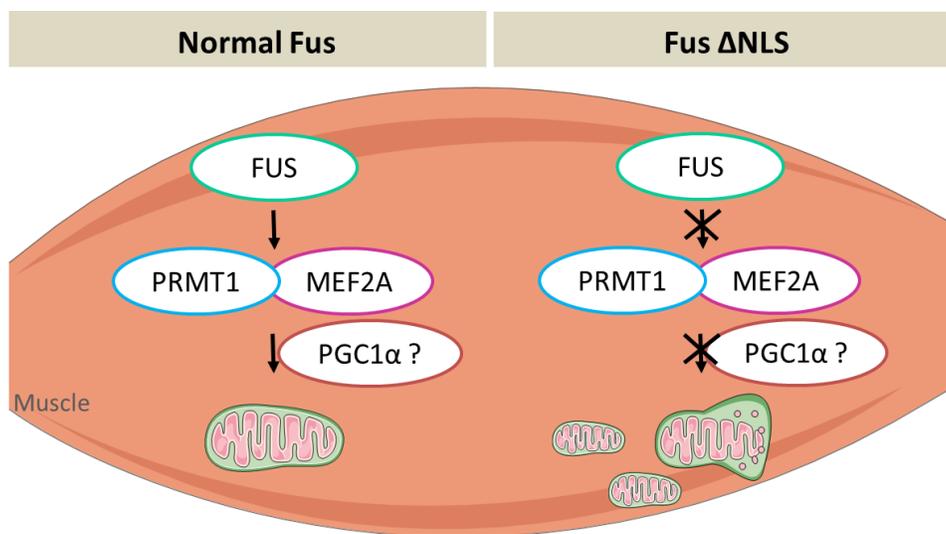


Figure 29 : Rôle de FUS dans le muscle

Dans les noyaux extra-synaptiques, FUS active MEF2A de façon dépendante de PRMT1. L'interaction entre ces trois protéines est requise pour l'activité mitochondriale et la différenciation musculaire. Le mutant FUS, quant à lui, inhibe l'activité de MEF2A et PRMT1 entraînant ainsi une diminution de l'activité mitochondriale et une structure anormale des mitochondries (fragmentation et gonflement) et du muscle (désorganisation des myofibrilles, une altération du réticulum sarcoplasmique). Un candidat potentiel dans ce mécanisme est PGC1 α , une protéine essentielle à l'activité mitochondriale et interagissant avec FUS, MEF2 et PRMT1.

FUS is required for muscle mitochondrial function and MEF2 transcriptional activity

Picchiarelli Gina, Goy Marc-antoine, Dieterlé Stéphane, Lagier-Tourenne Clotilde, Storkebaum Erik, Dupuis Luc.

Manuscript in preparation

Abstract

Mutations in the RNA-binding protein FUS cause juvenile forms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), with early onset and rapid disease progression. Most FUS mutations are located in or nearby the C-terminal nuclear localization sequence of FUS, leading to cytoplasmic accumulation of the protein. We recently demonstrated a critical role for FUS in stimulating the neuromuscular junction related gene expression program in subsynaptic nuclei of skeletal muscles, raising the question of potential other functions for FUS in skeletal muscle. Transcriptome analysis of muscles of knock-in Fus mice, expressing cytoplasmically mislocalized FUS protein and of Fus knock-out animals revealed striking common downregulation of genes related to mitochondrial function, including the master transcriptional co-activator PGC-1alpha. This was associated with profound loss in expression of multiple targets of the MEF2 transcription factors, in particular of MEF2A. Consistent with this, mitochondrial degeneration and disorganization of myofibrillar ultrastructure was observed in muscles of homozygous Fus knock-in and knock-out mice, and mitochondrial function and ultrastructure was focally affected in adult heterozygous Fus knock-in mice. Fus knockdown in C2C12 cells led to downregulation of MEF2 target genes, and disorganization of the mitochondrial network, while, conversely, overexpression of wild type, but not ALS-associated FUS mutants, was able to activate a MEF2-reporter in a MEF2A dependent manner, Furthermore, activation of a MEF2 reporter by MEF2A was dependent upon endogenous FUS. Importantly, this FUS/MEF2A pathway required PRMT1. Thus, FUS is required for muscle mitochondrial function and muscle structure through PRMT1-dependent MEF2A activation.

Introduction

Aggregation-prone RNA-binding proteins (RBPs) that contain prion-like domains emerged as central players in multiple neuromuscular diseases. Indeed, TDP-43, a multifunctional RNA and DNA-binding protein, involved in transcription, pre-mRNA splicing and mRNA transport (Lagier-Tourenne et al., 2010), is a major protein component of cytoplasmic aggregates in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and fronto-temporal dementia (FTD), two diseases with common genetic risk factors (Mackenzie et al., 2010, Neumann, 2009, Neumann et al., 2006)). Moreover, mutations in the TARDBP gene, encoding TDP-43, collectively account for about 5% of familial ALS cases (Gitcho et al., 2008, Kabashi et al., 2008, Neumann et al., 2006, Rutherford et al., 2008). Several other RBPs are involved in neuromuscular diseases, either through gene mutations or through their mislocalization in cytosolic aggregates. For instance, mutations and/or mislocalization in FUS, TAF15 and EWSR1, three RBPs closely related to each other (Couthouis et al., 2012, Couthouis et al., 2011, Kwiatkowski et al., 2009, Vance et al., 2009), but also in ataxin 2 (Elden et al., 2010), hnRNPA2B1 and A1 (Kim et al., 2013) and matrin-3 (Johnson et al., 2014) have been identified in ALS. Mutations in RBPs not only lead to ALS, but also to a variety of other neuromuscular diseases. For instance, hnRNPA2B1 and hnRNPA1 mutations were associated with a multisystemic clinical phenotype involving brain, muscle, motor neuron and/or bone (Kim et al., 2013), and matrin 3 mutations (Johnson et al., 2014) also cause a distal myopathy (Senderek et al., 2009). Beyond gene mutations, many RBP positive inclusions were observed in neuromuscular diseases other than ALS. In particular, in inclusion body myositis (IBM), another muscle disease with inflammatory and degenerative features, muscle fibers display RBP pathology involving TDP-43, FUS or other RBPs (Cortese et al., 2014, Custer et al., 2010, D'Agostino et al., 2011, Hernandez Lain et al., 2011, Salajegheh et al., 2009, Weihl et al., 2008, Yamashita et al., 2013). In all, RBP mutations or mislocalization appear associated with a number of neuromuscular diseases, ranging from pure muscle disease, to pure CNS involvement with various intermediate clinical pictures.

Mutations in the FUS gene, accounting for 4% of familial ALS cases, are usually associated with juvenile cases of ALS, characterized by disease onset and rapid disease progression. FUS pathology is found in a subset of FTD cases (Mackenzie et al., 2010) in the absence of germinal FUS mutation. To our knowledge, and contrary to other RBPs, there is currently no known FUS mutation associated with myopathic features. However, the FUS protein is mislocalized in IBM muscle, and FUS physically interacts with a number of critical proteins in muscle differentiation and structure, such as HnRNPA1 (Blokhuys et al., 2016, Kamelgarn et al., 2016), Matrin 3 (Blokhuys et al., 2016, Kamelgarn et al., 2016), DUX4 (Anseau et al., 2016), PTBP1 (Blokhuys et al., 2016) or PGC-1 alpha (Sanchez-Ramos et al., 2011). We have previously generated a knock-in Fus-ALS mouse model, which expresses cytoplasmic rather than nuclear FUS protein as a consequence of the deletion of the C-terminal nuclear localization sequence (Fus^{ΔNLS} mice) as well as Fus knockout mice (Fus^{-/-} mice) (Scekic-Zahirovic et al., 2016). Both Fus^{ΔNLS/ΔNLS} and Fus^{-/-} mice displayed similar phenotypes, most prominently perinatal lethality due to respiratory insufficiency, likely attributable to loss of nuclear FUS function. However, motor neuron loss was observed in Fus^{ΔNLS/ΔNLS} but not Fus^{-/-} mice, supporting that a gain-of-toxic-function mechanism is essential for motor neuron degeneration (Scekic-Zahirovic et al., 2016). Heterozygous Fus^{ΔNLS/+} mice develop a number of pathological hallmarks of ALS and adult-onset progressive motor neurodegeneration associated with motor deficits (Scekic-Zahirovic et al., 2017). In skeletal muscle, the FUS protein regulates the synapse-specific expression of AchR subunit genes in specialized subsynaptic nuclei through the ETS transcription factor Erm (Picchiarelli et al., submitted). Thus, ALS-mutant FUS is not only toxic to motor neurons but also to muscle fibers. However, the potential toxicity of FUS in muscle is still to be characterized. Here, we systematically analyzed the function of FUS and the consequences of the ΔNLS mutation in skeletal muscle, and demonstrate that nuclear FUS is required for proper mitochondrial function and activity of the key muscle transcription factors MEF2.

Results

Muscle transcriptome upon Fus mutations reveal FUS requirement for mitochondrial gene expression and MEF2 target gene expression

We previously showed that homozygous $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ and $Fus^{-/-}$ mice displayed perinatal lethality due to respiratory insufficiency, likely attributable to loss of nuclear FUS function, and that FUS is critically involved in neuromuscular junction establishment (Picchiarelli et al, submitted). To characterize mRNA splicing alterations as a consequence of Fus mutation, we exploited the RNA-mediated oligonucleotide Annealing, Selection, and Ligation with Next Generation sequencing (RASL-seq) method (Li et al., 2012, Zhou et al., 2012). This approach allowed us to quantitatively profile more than 3000 unique alternative splicing events that correspond to exon inclusion or skipping events conserved between mouse and human. Both Fus deletion and expression of truncated FUS led to splicing profiles distinct from controls. In $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ muscles, we detected 115 splicing events that were different from controls (defined by t-test with $p < 0.05$ and average fold change > 1.5) (Fig. 1A). In $Fus^{-/-}$ muscles, 249 detected splicing events were different from control littermates (Fig. 1B). Comparison of the splicing changes between $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ and $Fus^{-/-}$ mice revealed a striking overlap between both models. Fifty four splicing events were commonly regulated in $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ and $Fus^{-/-}$ mice, 100% of which were differentially included or excluded in the same direction (Fig. 1C). $Fus^{\Delta NLS/+}$ also demonstrated mild alterations of these 54 splicing events dependent on FUS function (Fig. 1C). We further performed RNA-seq on the same samples to evaluate expression changes in muscles in $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ and $Fus^{-/-}$ mice. Statistical comparison of FPKM values identified 1103 genes upregulated and 1397 genes downregulated in $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ mice (defined by $q < 0.05$) (Fig. 2A). Identical analysis in $Fus^{-/-}$ mice identified 197 upregulated genes and 1659 downregulated genes (Fig. 2B). Comparison of both models determined that most genes were identical between both models and were altered in the same direction, consistent with loss of FUS nuclear function underlying the altered levels of these transcripts. Gene ontology analysis showed that transcripts whose expression was down-regulated in both models were enriched for genes involved in mitochondrial function (Table 1). This is for instance exemplified by the

strong down regulation of *Ppargc1a*, encoding the master transcriptional co-activator PGC-1alpha, a known interactor of FUS (Sanchez-Ramos et al., 2011). To determine whether a discrete set of transcription factors could be involved in these massive gene expression changes, we performed analysis of distant regulatory elements in upregulated and downregulated genes using DiRE software (Gotea et al., 2008). Consistent with FUS being crucial for ETS-like transcription factors (such as Erm), many upregulated genes displayed ETS transcription factor binding sites (ELF1, ETS in Figure 1C). A large subset of the downregulated genes displayed regulatory elements for the transcription factor RSRFC4, also known as MEF2A (Figure 1C). Consistent with MEF2A being a critical transcription factor in downregulated genes, DIRE analysis also identified MYOD and Thyroid hormone receptors as involved in the regulation of this set of genes, and both are known interaction partners and co-regulatory transcription factors to MEF2A (Black et al., 1998, Lee et al., 1997, Taylor et al., 2017). Thus, these transcriptomic data point to FUS being critical in gene expression related to muscle mitochondrial function and MEF2 transcription factor activity.

Mitochondrial degeneration and abnormal ultrastructure in Fus mutant muscles

To determine whether this abnormal transcriptome translate into a phenotypic expression, we performed electron microscopy. In both *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} and *Fus*^{-/-} mice, we observed massive mitochondrial degeneration in gastrocnemius muscles at birth (Figure 2A-B). This was accompanied by myofibrillar disorganization, altered sarcoplasmic reticulum and glycogen content (Figure 2A-B). In adult *Fus*^{ΔNLS/+} mice, we observed consistent downregulation of the genes involved in muscle structure identified in RNAseq in homozygous mice, as well as altered expression of nuclear encoded mitochondrial proteins (Figure 3A). Furthermore, there were decreased number of cytochrome oxidase positive fibers in both gastrocnemius and soleus muscles at 10 months of age (Figure 3B-D) while SDH positive fibers remained relatively preserved, and mitochondrial respiration of permeabilized muscle fibers remained unaltered (data not shown). Indeed, alterations in mitochondrial ultrastructure remained focal in gastrocnemius muscle, with large areas preserved, and focal mitochondrial degeneration, characterized by fragmentations, swelling or complete destruction of mitochondria, at 22

months of age (Figure 3E). Thus, heterozygous *Fus* mutation leads to mildly altered mitochondrial and myofibrillar gene expression.

***Fus* knockdown leads to downregulation of MEF2 target genes and mitochondrial dysregulation in C2C12 cells**

It is tempting to speculate that the observed effects are direct consequences of *Fus* mutation in muscle cells. To investigate this possibility, we turned to a simplified cellular model, and treated C2C12 mouse myoblast cells with siRNA targeting *FUS* (siFus) or control siRNA (siCt) before 2 days of differentiation. As previously shown, siFus induced a strong knock-down of *FUS* expression, both at the transcript (Figure 4A) and the protein level (not shown). Consistent with RNAseq results, *FUS* knock-down substantially reduced expression of genes involved in muscle structure that are known MEF2 targets identified in RNAseq (Figure 4A). *FUS* knock down also downregulated a number of genes involved in mitochondrial function, including PGC-1alpha itself (Figure 4A), and disrupted mitochondrial network in C2C12 cells (Figure 4B), consistent with *FUS* interfering with this pathway. Interestingly, *Mef2a* knockdown recapitulated partially the observed transcriptional alterations, suggesting that all the effects of *Fus* loss of function were not caused by the unique loss of MEF2A (Figure 4B-C).

***FUS* is required for MEF2A transcriptional activity in C2C12 cells**

We then focused on potential mechanisms linking *FUS* and MEF2 target gene expression, and hypothesized that *FUS* would be required for MEF2 transcriptional activity. To test this hypothesis, we transfected C2C12 cells with a reporter construct in which luciferase expression is driven by a minimal *c-fos* promoter flanked by 3 MEF2 responsive elements. *Fus* knockdown was sufficient to decrease basal activity of this reporter construct, as well as MEF2A stimulated activity (Figure 5A). Conversely, overexpression of wild type human *FUS*, but not of *FUS* carrying the ALS-causing mutations R495X or P525L, strongly induced MEF2 reporter activity (Figure 5B), and potentiated MEF2A transcriptional activity (Figure 5C). Importantly, this activation of MEF2 reporter by *FUS* was mostly dependent upon endogenous MEF2A as siRNA knockdown of *Mef2a* was sufficient to severely blunt this activity (Figure 5D). Thus, *FUS* is required to activate MEF2A transcriptional activity.

PRMT1 is required for FUS-dependent MEF2A activation

Arginine methylation of FUS by PRMT1 is required for proper FUS localization (Dormann et al 2012), and a number of its transcriptional activities (Cui et al., 2018, Dormann et al., 2012, Dormann et al., 2010, Suarez-Calvet et al., 2016, Tibshirani et al., 2014, Tradewell et al., 2012). Intriguingly, PRMT1 appears upregulated during myogenesis (Shen et al., 2018) and its inhibition alters muscle differentiation and mitochondrial respiration (Shen et al., 2018), while its ablation in adult muscle stem cells impairs muscle regeneration through impairment of the myogenic transcription factors (Blanc et al., 2017a, Blanc et al., 2017b). Last, PRMT1 belongs to the same family than CARM1 that directly interacts with MEF2 to regulate muscle differentiation (Chen et al., 2002). Thus we hypothesized that PRMT1 might be required for FUS mediated activation of MEF2A. To substantiate this hypothesis, we first investigated whether broad inhibition of methyl transferases by ADOX had an effect on FUS-induced MEF2 transcriptional activity. Indeed, Adox treatment substantially decreased both basal FUS-induced MEF2 activity (Figure 6A) as well as the potentiation of MEF2A activity by FUS coexpression (Figure 6B). Consistently, PRMT1 knockdown by siRNA decreased FUS-induced and MEF2A-induced reporter activity (Figure 6C-D), and mRNA levels of the same target genes downregulated by Mef2a knockdown (Figure 6E). Thus PRMT1, FUS and MEF2A cooperate to drive MEF2A transcriptional activity.

Discussion

Our study demonstrates that loss of FUS function is sufficient to potently remodel muscle gene expression and trigger mitochondrial dysfunction and altered muscle ultrastructure. We further show that FUS is required for the activity of the key transcription factor MEF2A, suggesting that this FUS activity might underlie the observed muscle phenotypes in our *Fus* mutant mice.

Our first important result is that *Fus* mutation, either complete deletion or loss of nuclear FUS leads to strongly altered skeletal muscle phenotype. Indeed, both molecular and ultrastructural evidence point to drastic effects of both FUS truncation and FUS loss on muscle integrity. In RNAseq experiments, we observed highly significant downregulations of multiple genes related to muscle differentiation and mitochondrial function. Consistently, muscle ultrastructure of both mouse strains showed prominent alterations in muscle differentiation and mitochondrial morphology. Importantly, loss of only one copy of the deltaNLS mutation was sufficient to lead to mild but significant mitochondrial dysfunction and altered gene expression, suggesting that this role of FUS in muscle could be relevant for ALS patients carrying heterozygous FUS mutation. A number of previous studies had linked FUS to mitochondria. For instance, mitochondrial abnormalities have been observed in presynaptic terminals of wild type FUS overexpressing mice (So et al., 2018), in FUS overexpressing NSC34 cells (Stoica et al., 2016, Suzuki et al., 2015) and in primary motor neurons expressing ALS-linked FUS (Tradewell et al., 2012), and our results are consistent with transcriptomic analysis in another *Fus* knock-in mouse model (*Fus* delta14) that identified mitochondrial function as a target of FUS in the CNS, without identifying a specific mechanism (Devoy et al., 2017). Furthermore, Pink and Parkin, key players in mitochondrial homeostasis appear to modify FUS-induced degeneration in *Drosophila* (Chen et al., 2016). Most of the previous studies postulated that this alteration of mitochondria was resulting from a gain of function, and several mechanisms have been postulated including modulation of ER-mitochondria contacts (Stoica et al., 2016) and FUS binding to the mitochondrial chaperone Hsp60 (Deng et al., 2015). A novelty of our work is to show that loss of FUS is sufficient to alter mitochondrial function and muscle structure. Indeed, we observed similar phenotype in knock-in and knock-out muscles, and in muscle cells with *Fus* knockdown.

This contrasts with the toxicity of Fus mutation in motor neurons that require the presence of the mutant protein, and is consistent with our previous observation of a role of FUS in stimulating NMJ gene expression (Picchiarelli et al, submitted). Consistent with a specificity for FUS function in muscle, Fus knock-down did not modify mitochondrial ultrastructure in NSC34 cells (Stoica et al., 2016). To our knowledge, there is currently no documented mutation in the FUS gene in myopathies. However, mutations in closely related genes, such as HRNPA1 have been observed in multi-system atrophy, including in cases with major myopathic involvement (Kim et al., 2013). Furthermore, FUS interacts directly with a number of proteins associated with myopathies, and FUS aggregates have been identified in sporadic cases of inclusion body myositis (Anseau et al., 2016, Blokhuis et al., 2016, Kamelgarn et al., 2016). Together with our current results, these studies suggest that FUS could play a significant role in myopathies or other muscular diseases.

A second important result of our study is that FUS regulates the activity of MEF2 transcription factors, which might underlie the observed phenotypes in Fus mutant muscles. Our analysis of RNAseq results pointed out that the MEF2 transcription factors could be involved in the large set of downregulated genes common to both Fus^{ANLS/ANLS} and Fus^{-/-} mice. Supporting this hypothesis, we show that Mef2a knockdown partially recapitulates Fus knockdown effects on genes related to myofibril structure. Furthermore, MEF2 transcriptional activity is dependent upon Fus in C2C12 cells. Importantly, FUS overexpression potentiates MEF2A transcriptional activity, while ALS-linked FUS mutants are unable to activate MEF2A. Furthermore, FUS activation of MEF2 reporter is dependent upon endogenous Mef2a, suggesting that a direct mechanistic link between these two proteins. A potential mechanistic link between FUS and MEF2A is PRMT1, which is a known FUS interactor (Dormann et al., 2012, Tradewell et al., 2012), and also documented to regulate myogenesis (Blanc et al., 2017b). Indeed, we show that the FUS/MEF2A pathway is dependent upon PRMT1 presence. At this stage however, a number of uncertainties remain. First, we do not provide direct evidence linking altered muscle and mitochondrial ultrastructure to loss of MEF2A activity. Second, we do not provide a direct mechanism linking arginine methylation, dependent upon PRMT1, MEF2A and FUS. Our working

hypothesis is that FUS directs PRMT1 to MEF2A dependent promoters, leading to gene activation. If true, Fus knockdown should decrease PRMT1 binding and MEF2A arginine methylation, that is known to be important for MEF2 transcriptional activity (Chen et al., 2002). This working model will need to be experimentally challenged. Last, our results on MEF2A and PRMT1 only partially explain the transcriptional phenotype of Fus mutant muscles as Mef2a or Prmt1 knockdown alone are not sufficient to trigger decreased mitochondrial gene expression. It is indeed possible that mitochondrial gene expression regulation by FUS is independent of MEF2A and PRMT1. A reasonable candidate for this potential second pathway is PGC1alpha, as this protein directly interacts with FUS to regulate gene mitochondrial gene expression (Sanchez-Ramos et al., 2011). Interestingly PGC1alpha and MEF2 are strongly linked functionally and but mutual positive regulations (Czubryt et al., 2003, Handschin et al., 2003). Here again, potential relationships between MEF2A, PGC1 alpha and FUS remain to be investigated.

Summarizing, our current work identifies a critical function for FUS in muscle differentiation and mitochondrial function. This might be dependent upon a newly identified FUS function as a coactivator of MEF2A transcription factor. Interestingly, this might have also relevance for ALS/FTD pathogenesis besides skeletal muscle, as MEF2 transcription factors are critical in synaptic function in mammals.

Materials and methods

Compliance with ethical standards

Mouse experiments were approved by local ethical committee from Strasbourg University (CREMEAS) under reference number 2015070711529814 and 2016021114497517.

Animals

Transgenic mice were housed in the Faculty of medicine from Strasbourg University and in the animal facility of the Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, with 12/12 hours of light/dark cycle and unrestricted access to food and water.

Fus knock-in mice have been generated in the Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, Strasbourg) and were previously described (Scekic-Zahirovic et al., 2017, Scekic-Zahirovic et al., 2016). This mouse strain expresses a truncated FUS protein that lacks the PY-NLS, which is encoded by exon 15 of the Fus gene. This mutation can be reverted to a wild type FUS protein upon CRE-mediated recombination (Scekic-Zahirovic et al., 2017, Scekic-Zahirovic et al., 2016). Mice heterozygous and homozygous for the targeted allele will hereafter be referred to as $Fus^{\Delta NLS/+}$ and $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$, respectively.

Fus knock-out mice have been generated by the transgenesis facility of the Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, using ES cells obtained from the European Conditional Mouse Mutagenesis Consortium (EUCOMM) and were previously described (Scekic-Zahirovic et al., 2017, Scekic-Zahirovic et al., 2016). The genetic background of all mice used in this study is C57Bl6/J.

RNA sequencing

RNA quality was measured using the Agilent Bioanalyzer system according to the manufacturer's recommendations. Library was described previously (Parkhomchuk et al., 2009). 8 pM of amplified libraries was used for sequencing on the Illumina GA2 for 72 cycle. Bioinformatic analysis was performed with Distant Regulatory Elements of co regulated genes (Gotea et al., 2008).

Histology and immunohistochemistry in mice tissues

Unfixed muscles embedded in OCT (Tissue-Tek® O.C.T.Compound, Sakura, 4583) were frozen in melting isopentane after cryoprotection in PBS 30% sucrose. Serial cuts of 14µm thick were made with cryostat (Leica CM 3050S) and deposited on Surperfrost® slides (Superfrost, VWR, 631-0448). Slides were dried 30min at 40°C then acetone solution was added during 15 minutes at 4°C.

For SDH, staining was performed during 1h at room temperature with succinate dehydrogenase solution composed of 1% sodium succinate dibasic (Sigma, S2378), 0.2% nitroblue tetrazolium (Sigma, N6876) completed with phenazine methosulphate (Sigma, P9625). Finally, sections were washed with water and mounted in aquapolymount (Polysciences, 18606-5).

For COX, staining was performed during 1h at room temperature with cytochrom c oxidase solution composed of cytochrome c, sucrose, catalase and 3,3'-Diaminobenzidine DAB. Slides were dehydrated in an increasing concentration of ethanol baths followed by a xylene bath.

Finally, slides were mounted with histokit (Roth, 6638.1).

Electron microscopy

Mice were anesthetized with intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine chlorhydrate and 5mg/kg xylazine and transcardiacally perfused with glutaraldehyde (2.5% in 0.1M cacodylate buffer at pH 7.4) Gastrocnemius muscles were dissected and immersed in the same fixative overnight. After 3 rinses in Cacodylate buffer (EMS, 11650), muscles were post fixed in 0.5% osmium and 0.8% potassium ferrocyanide in Cacodylate buffer 1h at room temperature. Finally, muscles were dehydrated in graded ethanol series and embedded in Embed 812 (EMS, 13940). The ultrathin sections (50 nm) were cut with an ultramicrotome (Leica, EM UC7), counterstained with uranyl acetate (1% (w/v) in 50% ethanol) and observed with a Hitachi 7500 transmission electron microscope (Hitachi High Technologies Corporation, Tokyo, Japan) equipped with an AMT Hamamatsu digital camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan).

C2C12 myoblast culture experiments

C2C12 myoblast culture

C2C12 myoblast cells were purchased from ATCC (ATCC® CRL-1772™). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% Fetal Bovine Serum (Fisher scientific, 11531831) and 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma, P4333) at 37 °C in an incubator with 5% CO₂. Between 60 and 80% of confluency, myoblasts were differentiated in myotubes with differentiation medium (identical medium, with 0.1% Fetal Bovine Serum). Culture medium was changed every day and transfections were performed between 5-15 passages.

siRNA Transfection

C2C12 were cultured in 6-well plates until 60% of confluency. Cells were transfected with siRNA in differentiation medium using Lipofectamine RNA iMAX (Fischer scientific sas, 13778150) according to the manufacturer's instructions. siRNA against FUS, Mef2a, PRMT1, PGC1 α and negative control siRNA were provided by Dharmacon (respectively D-001810-1020, L-041004-00-0005, L-049497-00-0005, L-040773-01-0005 and L-051741-00-0050). Cells were harvested 48h after transfection.

Plasmid Transfection and luciferase assay

C2C12 were cultured in 24 well-plates until 80% of confluency. Transfection was performed in differentiation medium with expression and reporter plasmids using TransIT-X2 (MIR6000, Myrus) according to the manufacturer's instructions.

Expression vectors used for transfections were: pCMV empty plasmid, pCMV-Myc-FUS (expressing N-terminal myc-tagged human wild type FUS), pCMV-Myc-FUS-R495X, pCGNMEF2A (addgene, 32958), pCGN-MEF2B (Addgene, 32959), PRMT1 (reference), pCIPGC1a obtained from Hanna.

Reporter plasmids were pGL3-MEF2-luc (addgene, 32967), pcDNA3.1-chrnd-luc and pcDNA3.1-CMV-luc obtained from L. Schaeffer (Lyon, France). After 24h of transfection, proteins were extracted and luciferase activity was measured (Promega, E4550) and normalized by total proteins measured with BCA assay (Interchim, UP95424A, UP95425A).

RNA extraction and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from C2C12 using TRIzol® reagent (Life Technologies). 1 µg of RNA was reverse transcribed with iScript™ reverse transcription (Biorad, 1708841). Quantitative polymerase chain reaction was performed using Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and quantified with Bio-Rad software. Gene expression was normalized by calculating a normalization factor using H2A Histone Family Member X (H2AX), Histone Cluster 1 H2A Family Member C (H2AC), Histone Cluster 1 H2B Family Member C (H1H2BC) genes according to GeNorm (Vandesompele et al., 2002) Primer sequences were as follows:

H2AX: F-TCCTGCCCAACATCCAGG, R-TCAGTACTCCTGAGAGGCCTGC

H2AC: F-CAACGACGAGGAGCTCAACAAG, R-GAAGTTTCCGCAGATTCTGTTGC

H1H2BC: F-AACAAGCGCTCGACCATCA, R-GAATTCGCTACGGAGGCTTACT

Acta1: F- TTGTGTGTGACAACGGCTCT, R- CCACGATGGATGGGAACACA

Actn3: F- GTGCCAGCTGGAGATCAACT, R- ACGCATTGGCTATGTCCGAA

ATG: F- GCCCTCCACACTAGTTGACC, R- GACGGATTGACAGCCAGGAA

Pdlim3 : F- TGGAAAAGCACACCCCTTCA, R- CAATGTTTGCTGCTGCTACGA

Myl3 : F-GGTCAGAATCCTACCCAGGC, R- CTGGAGCATAGGCAGGAACG

MyoZ1: F- GGGGGTTGATCCTCAGCAAA, R- TGGAAGGTCATGCGTTTGGGA

MyoZ2: F- TGCCATGGTGAAGCAAAGGA, R- CATGCCGTCAACATCATGTCC

Cox5a: F-GCTGTCTGTTCCATTCGCTG, R- AATATGTCACCCAGCGAGCA

Cox8b: F- CAGCCAAAACCTCCCACTTCC, R- GTGGGCTAAGACCCATCCTG

Sdha: F- GTGTGAAGTAGGGCAGGTCC, R- ACAAGGCACTGGCTCGATAC

ATP5G3: F- CGCACCCCGCTCTG, R- TAGAGCCCTCTCCAGTCCTAGTC

Uqcrc2: F- AACTGCTAGAGCCATGAAGC, R- AAGTTTTAACCTTCGGGGCAAC

Mitotracker staining

C2C12 were cultured in 12-well plates coated with collagen until 60% of confluency. Cells were transfected with siRNA in differentiation medium using Lipofectamine RNA iMAX (Fischer scientific sas, 13778150) according to the manufacturer's instructions. siRNA against FUS, Mef2a, PRMT1 and negative control siRNA were provided by Dharmacon (respectively D001810-10-20, L-041004-00-0005, L-049497-00-0005 and L-051741-00-0050). Cells were harvested 48h after transfection. During the last 2h of transfection, add mitotracker at 50nM (Invitrogen, M7510). After washes with PBS, cells were fixed 10min with PFA 4% and mounted in mounting medium with DAPI (VectaShield) for confocal imaging.

Statistics

All results from analysis are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) and differences were considered significant when $p < 0.05$. Significance is presented as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

For comparison of two groups, two-tailed unpaired Student's t -test was used in combination with F-test to confirm that the variances between groups were not significantly different. Comparison for more than two groups was performed using one-way ANOVA and Tukey or Bonferroni's multiple comparison post hoc test.

Data were analyzed by using the GrapPad Prism version 6.0.

References

- Anseau E, Eidahl JO, Lancelot C, Tassin A, Matteotti C, Yip C, Liu J, Leroy B, Hubeau C, Gerbaux C, Cloet S, Wauters A, Zorbo S, Meyer P, Pirson I, Laoudj-Chenivresse D, Wattiez R, Harper SQ, Belayew A, Coppee F (2016) Homologous Transcription Factors DUX4 and DUX4c Associate with Cytoplasmic Proteins during Muscle Differentiation. *PLoS One* 11: e0146893
- Black BL, Olson EN (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 167-96
- Blanc RS, Richard S (2017a) Regenerating muscle with arginine methylation. *Transcription* 8: 175-178
- Blanc RS, Vogel G, Li X, Yu Z, Li S, Richard S (2017b) Arginine Methylation by PRMT1 Regulates Muscle Stem Cell Fate. *Mol Cell Biol* 37
- Blokhuis AM, Koppers M, Groen EJ, van den Heuvel DM, Dini Modigliani S, Anink JJ, Fumoto K, van Diggelen F, Snelting A, Soodar P, Verheijen BM, Demmers JA, Veldink JH, Aronica E, Bozzoni I, den Hertog J, van den Berg LH, Pasterkamp RJ (2016) Comparative interactomics analysis of different ALS-associated proteins identifies converging molecular pathways. *Acta Neuropathol* 132: 175-96
- Chen SL, Loffler KA, Chen D, Stallcup MR, Muscat GE (2002) The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. *J Biol Chem* 277: 4324-33
- Chen Y, Deng J, Wang P, Yang M, Chen X, Zhu L, Liu J, Lu B, Shen Y, Fushimi K, Xu Q, Wu JY (2016) PINK1 and Parkin are genetic modifiers for FUS-induced neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 25: 5059-5068
- Cortese A, Plagnol V, Brady S, Simone R, Lashley T, Acevedo-Arozena A, de Silva R, Greensmith L, Holton J, Hanna MG, Fisher EM, Fratta P (2014) Widespread RNA metabolism impairment in sporadic inclusion body myositis TDP-43-proteinopathy. *Neurobiol Aging* 35: 1491-8
- Couthouis J, Hart MP, Erion R, King OD, Diaz Z, Nakaya T, Ibrahim F, Kim HJ, MojsilovicPetrovic J, Panossian S, Kim CE, Frackelton EC, Solski JA, Williams KL, ClayFalcone D, Elman L, McCluskey L,

Greene R, Hakonarson H, Kalb RG et al. (2012) Evaluating the role of the FUS/TLS-related gene EWSR1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 21: 2899-911

Couthouis J, Hart MP, Shorter J, DeJesus-Hernandez M, Erion R, Oristano R, Liu AX, Ramos D, Jethava N, Hosangadi D, Epstein J, Chiang A, Diaz Z, Nakaya T, Ibrahim F, Kim HJ, Solski JA, Williams KL, Mojsilovic-Petrovic J, Ingre C et al. (2011) A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 20881-90

Cui W, Yoneda R, Ueda N, Kurokawa R (2018) Arginine methylation of translocated in liposarcoma (TLS) inhibits its binding to long noncoding RNA, abrogating TLS-mediated repression of CBP/p300 activity. *J Biol Chem*

Custer SK, Neumann M, Lu H, Wright AC, Taylor JP (2010) Transgenic mice expressing mutant forms VCP/p97 recapitulate the full spectrum of IBMPFD including degeneration in muscle, brain and bone. *Hum Mol Genet* 19: 1741-55

Czubryt MP, McAnally J, Fishman GI, Olson EN (2003) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1711-6

D'Agostino C, Nogalska A, Engel WK, Askanas V (2011) In sporadic inclusion body myositis muscle fibres TDP-43-positive inclusions are less frequent and robust than p62 inclusions, and are not associated with paired helical filaments. *Neuropathology and applied neurobiology* 37: 315-20

Deng J, Yang M, Chen Y, Chen X, Liu J, Sun S, Cheng H, Li Y, Bigio EH, Mesulam M, Xu Q, Du S, Fushimi K, Zhu L, Wu JY (2015) FUS Interacts with HSP60 to Promote Mitochondrial Damage. *PLoS Genet* 11: e1005357

Devoy A, Kalmar B, Stewart M, Park H, Burke B, Noy SJ, Redhead Y, Humphrey J, Lo K, Jaeger J, Mejia Maza A, Sivakumar P, Bertolin C, Soraru G, Plagnol V, Greensmith L, Acevedo Arozena A, Isaacs AM, Davies B, Fratta P et al. (2017) Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in 'FUSDelta14' knockin mice. *Brain* 140: 2797-2805

Dormann D, Madl T, Valori CF, Bentmann E, Tahirovic S, Abou-Ajram C, Kremmer E, Ansorge O, Mackenzie IR, Neumann M, Haass C (2012) Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS. *EMBO J* 31: 4258-75

Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, Than ME, Mackenzie IR, Capell A, Schmid B, Neumann M, Haass C (2010) ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J* 29: 2841-57

Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, Aramkola M, Geser F, Greene R, Lu MM, Padmanabhan A, Clay-Falcone D, McCluskey L, Elman L, Juhr D, Gruber PJ, Rub U, Auburger G, Trojanowski JQ, Lee VM et al. (2010) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466: 1069-75

Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, Levitch D, Hatanpaa KJ, White CL, 3rd, Bigio EH, Caselli R, Baker M, Al-Lozi MT, Morris JC, Pestronk A, Rademakers R, Goate AM, Cairns NJ (2008) TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol* 63: 535-8

Gotea V, Ovcharenko I (2008) DiRE: identifying distant regulatory elements of co-expressed genes. *Nucleic Acids Res* 36: W133-9

Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM (2003) An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7111-6

Hernandez Lain A, Millecamps S, Dubourg O, Salachas F, Bruneteau G, Lacomblez L, LeGuern E, Seilhean D, Duyckaerts C, Meininger V, Mallet J, Pradat PF (2011) Abnormal TDP-43 and FUS proteins in muscles of sporadic IBM: similarities in a TARDBP-linked ALS patient. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82: 1414-6

Johnson JO, Pioro EP, Boehringer A, Chia R, Feit H, Renton AE, Pliner HA, Abramzon Y, Marangi G, Winborn BJ, Gibbs JR, Nalls MA, Morgan S, Shoai M, Hardy J, Pittman A, Orrell RW, Malaspina A, Sidle KC, Fratta P et al. (2014) Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 17: 664-6

Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA (2008) TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40: 572-4

Kamelgarn M, Chen J, Kuang L, Arenas A, Zhai J, Zhu H, Gal J (2016) Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS. *Biochim Biophys Acta* 1862: 2004-14

Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, MacLea KS, Freibaum B, Li S, Molliex A, Kanagaraj AP, Carter R, Boylan KB, Wojtas AM, Rademakers R, Pinkus JL, Greenberg SA, Trojanowski JQ, Traynor BJ, Smith BN et al. (2013) Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495: 467-73

Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N et al. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323: 1205-8

Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW (2010) TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 19: R46-64

Lee Y, Nadal-Ginard B, Mahdavi V, Izumo S (1997) Myocyte-specific enhancer factor 2 and thyroid hormone receptor associate and synergistically activate the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol* 17: 2745-55

Li H, Qiu J, Fu XD (2012) RASL-seq for massively parallel and quantitative analysis of gene expression. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M Ausubel [et al] Chapter 4: Unit 4 13 1-9

Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M (2010) TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 9: 995-1007

Neumann M (2009) Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *Int J Mol Sci* 10: 232-46

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130-3

Parkhomchuk D, Borodina T, Amstislavskiy V, Banaru M, Hallen L, Krobitch S, Lehrach H, Soldatov A (2009) Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucleic Acids Res* 37: e123

Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YF, Stewart H, Kelley BJ, Kuntz K, Crook RJ, Sreedharan J, Vance C, Sorenson E, Lippa C, Bigio EH, Geschwind DH, Knopman DS, Mitsumoto H, Petersen RC, Cashman NR et al. (2008) Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 4: e1000193

Salajegheh M, Pinkus JL, Taylor JP, Amato AA, Nazareno R, Baloh RH, Greenberg SA (2009) Sarcoplasmic redistribution of nuclear TDP-43 in inclusion body myositis. *Muscle Nerve* 40: 19-31

Sanchez-Ramos C, Tierrez A, Fabregat-Andres O, Wild B, Sanchez-Cabo F, Arduini A, Dopazo A, Monsalve M (2011) PGC-1alpha regulates translocated in liposarcoma activity: role in oxidative stress gene expression. *Antioxid Redox Signal* 15: 32537

Scekic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, Wagner M, Sun Y, Allmeroth K, Dieterle S, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, Rene F, Dormann D, Haass C, Ludolph AC, Lagier-Tourenne C, Storkebaum E, Dupuis L (2017) Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133: 887-906

Scekic-Zahirovic J, Sendscheid O, El Oussini H, Jambeau M, Sun Y, Mersmann S, Wagner M, Dieterle S, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, Drenner K, Birling MC, Qiu J, Zhou Y, Li H, Fu XD, Rouaux C, Shelkownikova T, Witting A, Ludolph AC et al. (2016) Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J* 35: 1077-1097

Senderek J, Garvey SM, Krieger M, Guergueltcheva V, Urtizbera A, Roos A, Elbracht M, Stendel C, Tournev I, Mihailova V, Feit H, Tramonte J, Hedera P, Crooks K, Bergmann C, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Lochmuller H, Seboun E, Weis J et al. (2009) Autosomal-dominant distal myopathy associated with a recurrent missense mutation in the gene encoding the nuclear matrix protein, matrin 3. *Am J Hum Genet* 84: 511-8

Shen NY, Ng SY, Toepp SL, Ljubcic V (2018) Protein arginine methyltransferase expression and activity during myogenesis. *Biosci Rep* 38

So E, Mitchell JC, Memmi C, Chennell G, Vizcay-Barrena G, Allison L, Shaw CE, Vance C (2018) Mitochondrial abnormalities and disruption of the neuromuscular junction precede the clinical phenotype and motor neuron loss in hFUSWT transgenic mice. *Hum Mol Genet* 27: 463-474

Stoica R, Paillusson S, Gomez-Suaga P, Mitchell JC, Lau DH, Gray EH, Sancho RM, VizcayBarrena G, De Vos KJ, Shaw CE, Hanger DP, Noble W, Miller CC (2016) ALS/FTD-associated FUS activates GSK-3beta to disrupt the VAPB-PTPIP51 interaction and ER-mitochondria associations. *EMBO Rep* 17: 1326-42

Suarez-Calvet M, Neumann M, Arzberger T, Abou-Ajram C, Funk E, Hartmann H, Edbauer D, Kremmer E, Gobl C, Resch M, Bourgeois B, Madl T, Reber S, Jutzi D, Ruepp MD, Mackenzie IR, Ansorge O, Dormann D, Haass C (2016) Monomethylated and unmethylated FUS exhibit increased binding to Transportin and distinguish FTLDFUS from ALS-FUS. *Acta Neuropathol* 131: 587-604

Suzuki H, Matsuoka M (2015) Overexpression of nuclear FUS induces neuronal cell death. *Neuroscience* 287: 113-24

Taylor MV, Hughes SM (2017) Mef2 and the skeletal muscle differentiation program. *Semin Cell Dev Biol* 72: 33-44

Tibshirani M, Tradewell ML, Mattina KR, Minotti S, Yang W, Zhou H, Strong MJ, Hayward LJ, Durham HD (2014) Cytoplasmic sequestration of FUS/TLS associated with ALS alters histone marks through loss of nuclear protein arginine methyltransferase 1. *Hum Mol Genet*

Tradewell ML, Yu Z, Tibshirani M, Boulanger MC, Durham HD, Richard S (2012) Arginine methylation by PRMT1 regulates nuclear-cytoplasmic localization and toxicity of FUS/TLS harbouring ALS-linked mutations. *Hum Mol Genet* 21: 136-49

Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM et al. (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323: 1208-11

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research0034.1– 0034.11

Weihl CC, Temiz P, Miller SE, Watts G, Smith C, Forman M, Hanson PI, Kimonis V, Pestronk A (2008) TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 1186-9

Yamashita S, Kimura E, Tawara N, Sakaguchi H, Nakama T, Maeda Y, Hirano T, Uchino M, Ando Y (2013) Optineurin is potentially associated with TDP-43 and involved in the pathogenesis of inclusion body myositis. *Neuropathology and applied neurobiology* 39: 406-16

Zhou Z, Qiu J, Liu W, Zhou Y, Plocinik RM, Li H, Hu Q, Ghosh G, Adams JA, Rosenfeld MG, Fu XD (2012) The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. *Mol Cell* 47: 422-33

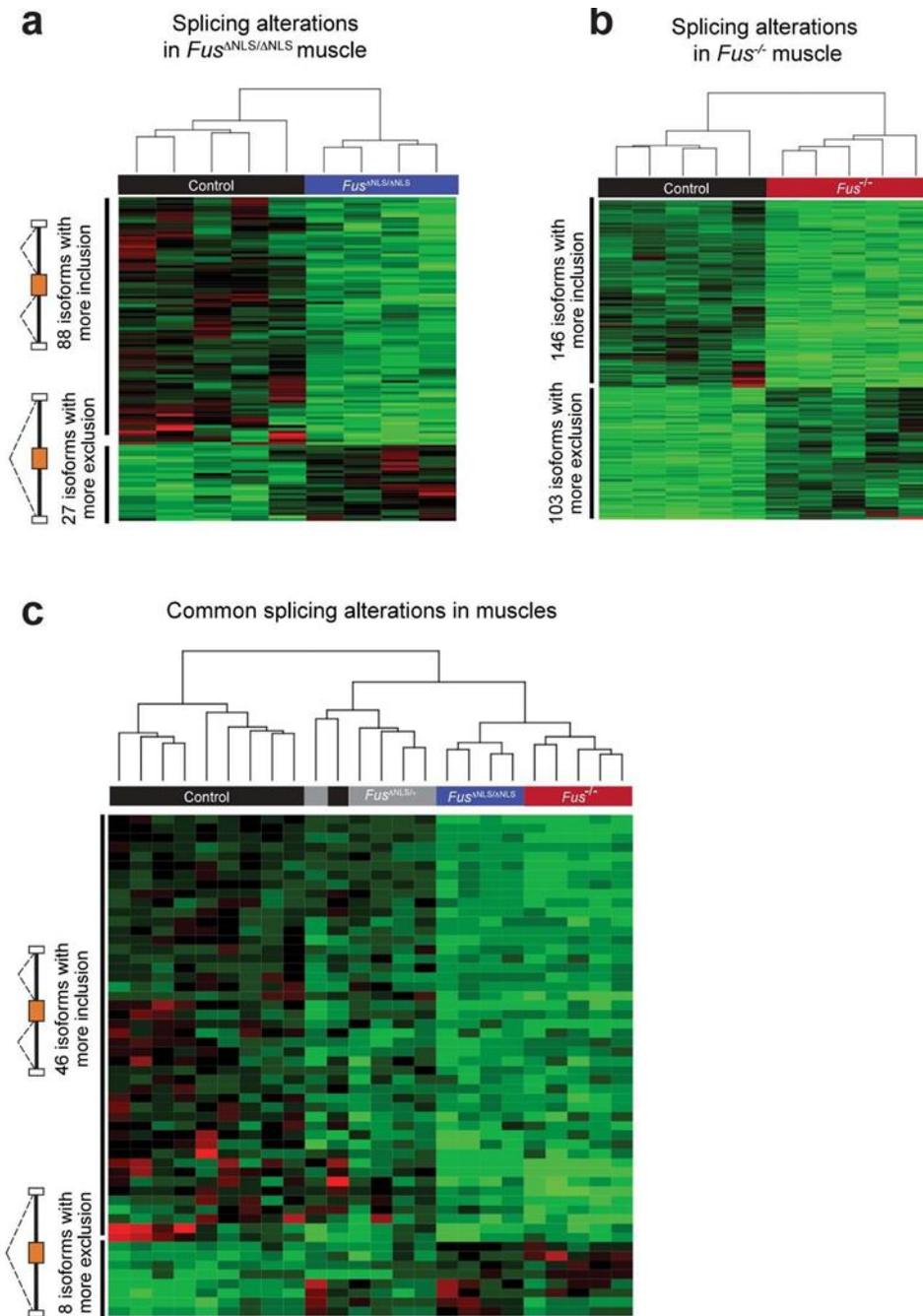


Figure 1: FUS-dependent alternative splicing alterations in mouse muscle

A. Heat map with hierarchical clustering of RASL-seq data from biological replicates of $Fus^{ANLS/ANLS}$ (N = 5) and control littermates (N = 4), showing splicing differentially regulated between both genotypes.

B. Heat map with hierarchical clustering of RASL-seq data from biological replicates of $Fus^{-/-}$ and control littermates, showing splicing differentially regulated between both genotypes.

C. Comparison of the splicing changes between $Fus^{ANLS/ANLS}$ and $Fus^{-/-}$ mice revealed 54 common splicing regulations in muscles.

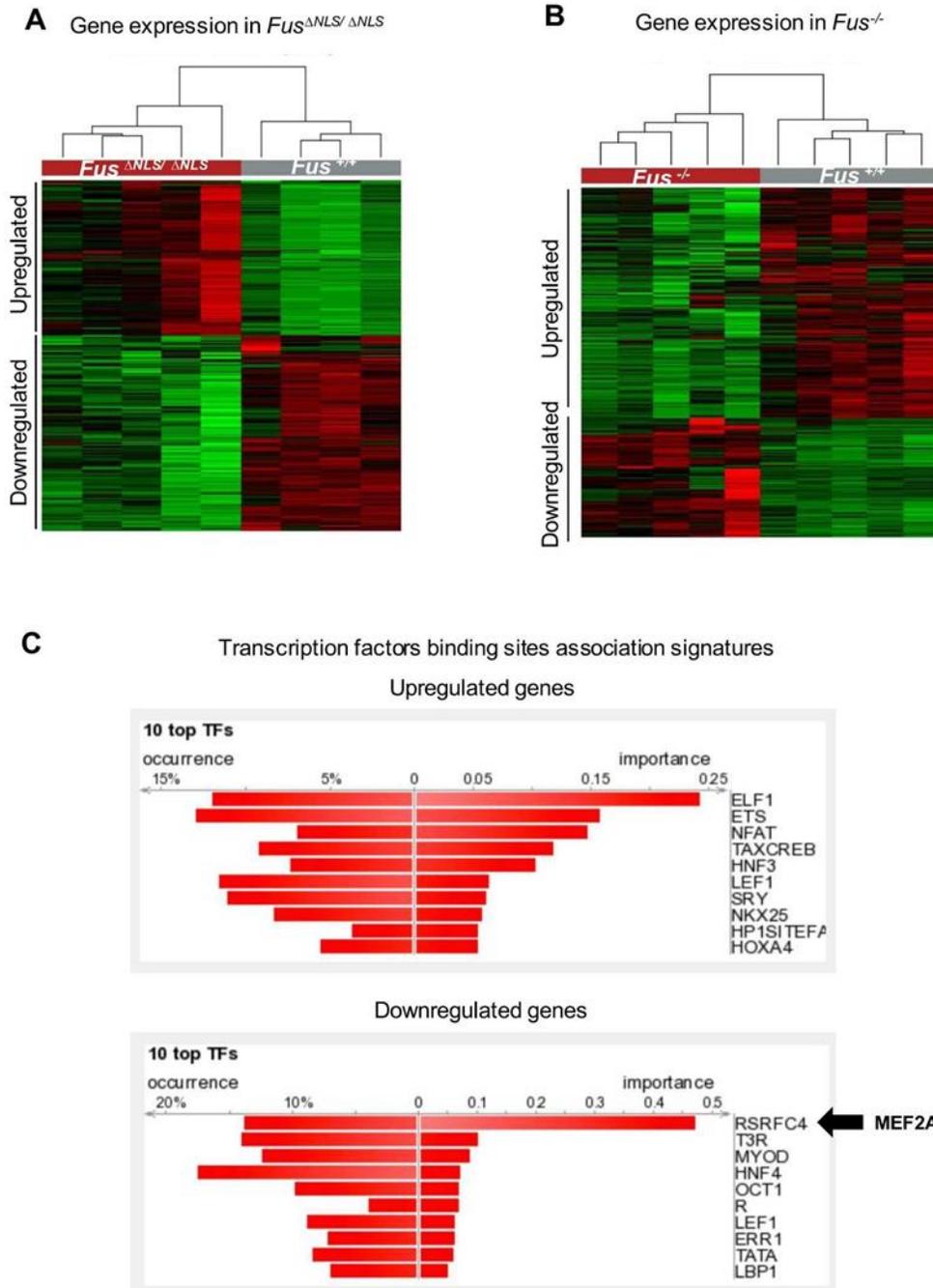


Figure 2: FUS is required for mitochondrial gene expression and MEF2 target gene expression

A. Heat map with hierarchical clustering of RNA-seq data from biological replicates of *Fus*^{ΔNLS/ΔNLS} (N = 5) and control littermates (N = 4), showing genes differentially regulated between both genotypes.

B. Heat map with hierarchical clustering of RNA-seq data from biological replicates of *Fus*^{-/-} and control littermates, showing genes differentially regulated between both genotypes.

C. DIRE analysis of up and downregulated genes identify MEF2A as critically involved in downstream effects of FUS loss of function in muscle

Gene Ontology terms	FDR in FUS KI muscles	FDR in FUS KO muscles
GO:0006091: generation of precursor metabolites and energy	3.15E-21	1.32E-56
GO:0005739: mitochondrion	1.08E-12	2.24E-50
mmu00190: Oxidative phosphorylation	1.47E-07	7.20E-38
GO:0015980: energy derivation by oxidation of organic compounds	8.83E-15	3.57E-25
GO:0043292: contractile fiber	5.50E-31	1.71E-23
GO:0030016: myofibril	1.59E-29	2.81E-24
GO:0016528: sarcoplasm	2.04E-14	1.99E-11
GO:0003779: actin binding	7.25E-12	1.92E-06

Table 1: Main functional categories enriched within the genes downregulated in muscles from FUS KI and FUS KO mice

Gene ontology of downregulated genes in muscle of $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ and $Fus^{-/-}$ showed enrichment for genes involved in mitochondrial function.

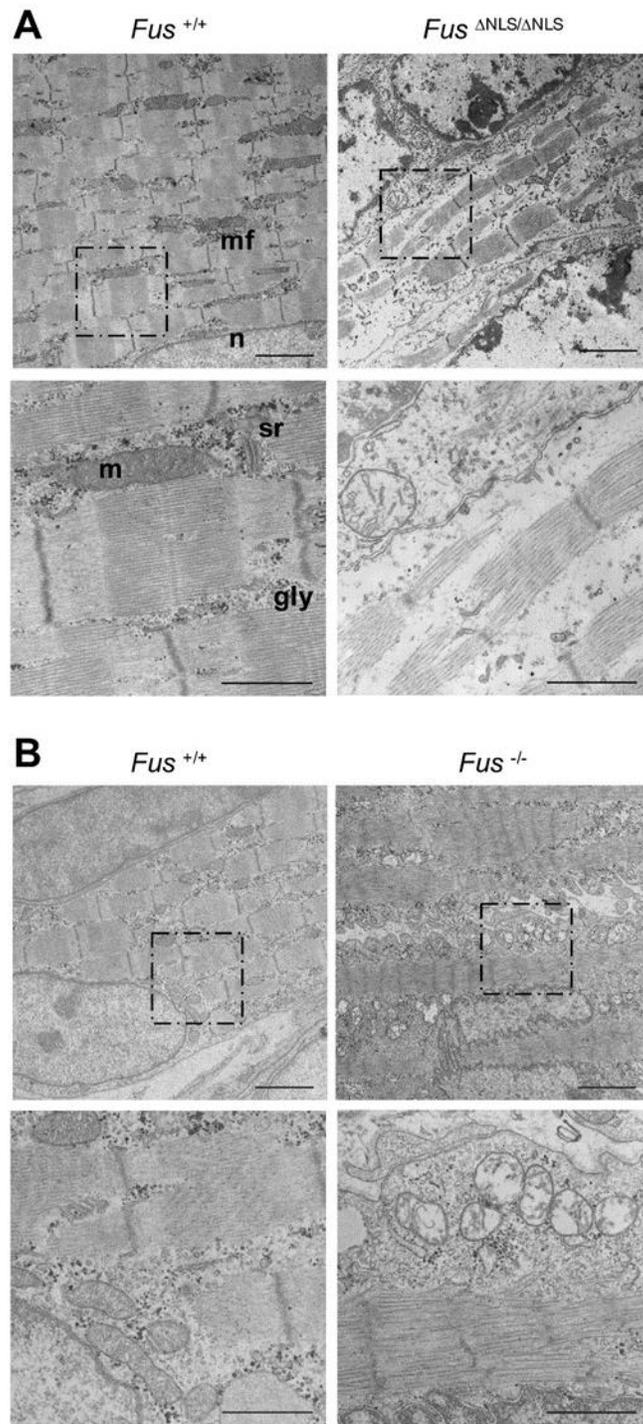


Figure 3: FUS is required for mitochondrial and myofibrillar ultrastructure

Representative electron micrographies of gastrocnemius muscle in $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$ (A) and $Fus^{-/-}$ (B) and their respective wild type littermates. Higher magnification of the squared box is shown in the lower row of each panel. Scale bar: $2.5\mu m$ (upper row), $1\mu m$ (lower row).

Please note disorganized sarcoplasmic reticulum, altered mitochondrial ultrastructure and lack of glycogen in Fus mutant muscles.

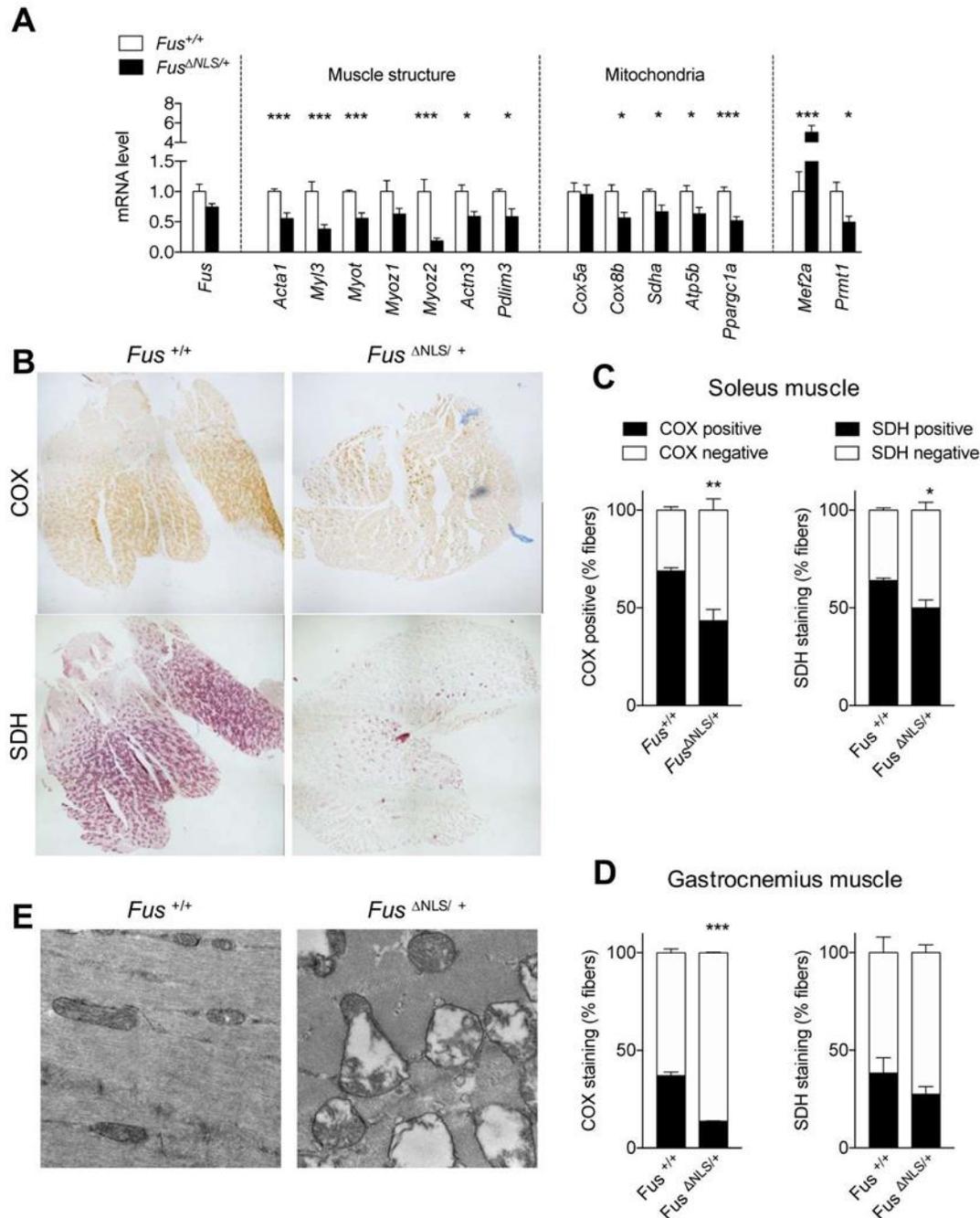


Figure 4: Heterozygous *Fus* mutation is sufficient to alter mitochondria in adult muscles

A. mRNA levels of identified targets genes in 1 month old tibialis anterior muscle of *Fus*^{ΔNLS/+} and wild type littermates (3 transfections).

B-D. Representative COX (upper row) and SDH (lower row) staining in 10 months old gastrocnemius and soleus muscles of *Fus*^{ΔNLS/+} and wild type littermates (N=5).

C and D show quantification of percentage of positive fibers for COX and SDH stainings in soleus (C) and gastrocnemius (D) muscles (N=5).

E. Representative electron micrographies of gastrocnemius muscle in *Fus*^{ΔNLS/+} and wild type littermates (N=3).

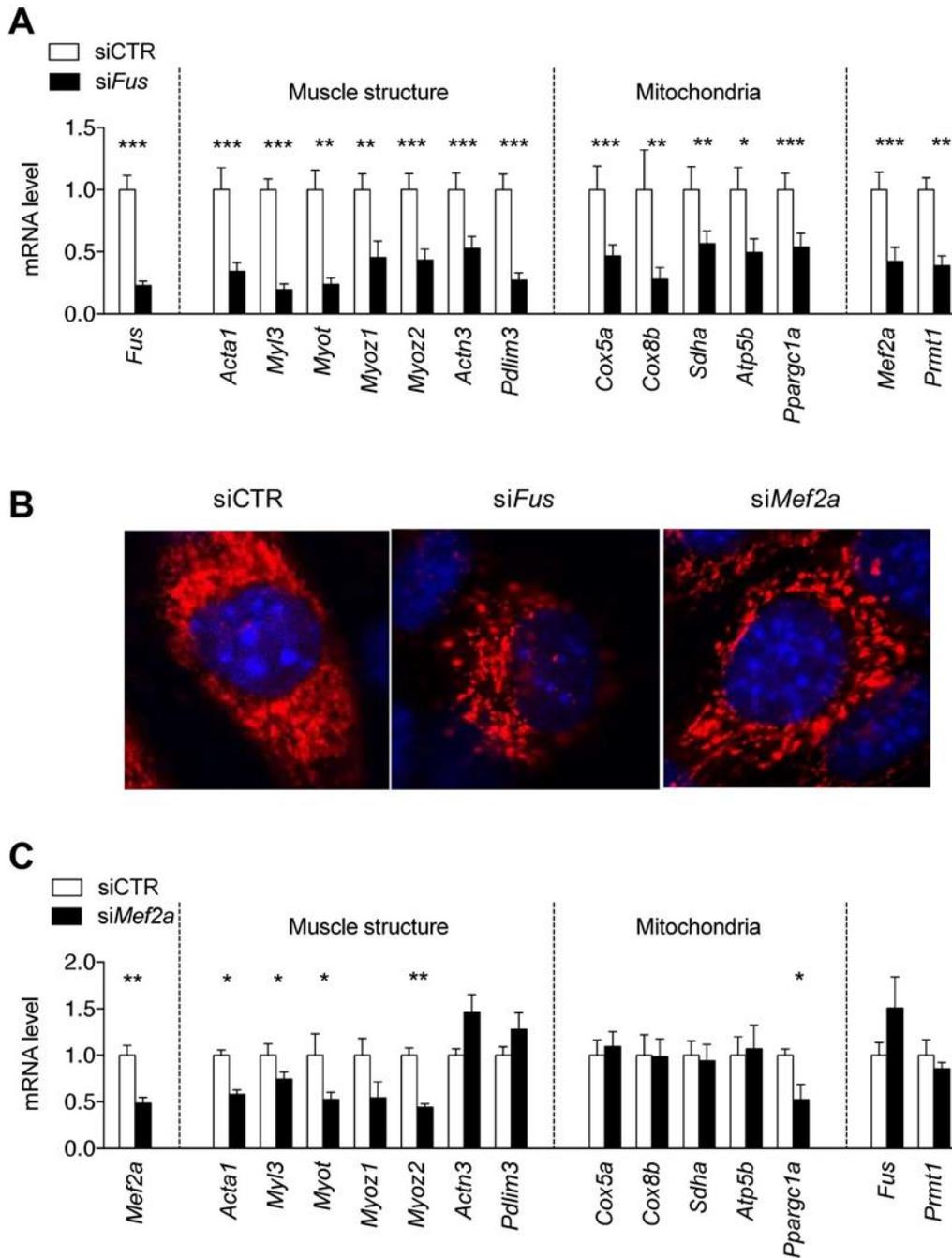


Figure 5: Fus and Mef2a knockdown recapitulates altered gene expression levels and mitochondrial abnormalities observed in vivo in Fus mutant muscles

A. mRNA levels of identified targets genes in C2C12 cells transfected with siCTR or siFus (3 transfections).

B. Representative mitochondrial morphology as assessed using Mitotracker in C2C12 cells transfected with either siCTR, siFus or siMef2a (3 transfections).

C. mRNA levels of identified targets genes in C2C12 cells transfected with siCTR or siMef2a (3 transfections).

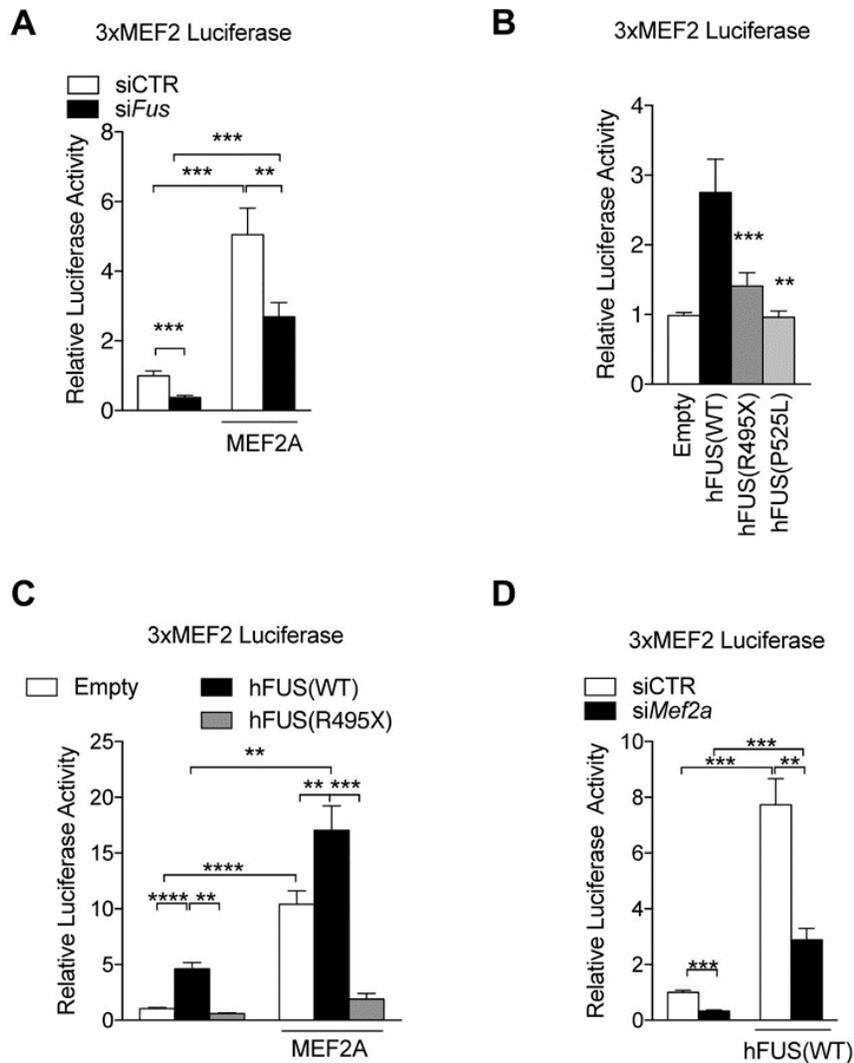


Figure 6: FUS synergizes with MEF2A to activate MEF2 responsive genes

A-D: Relative luciferase activity of C2C12 cells transfected with a reporter plasmid including the luciferase ORF under the control of 3 MEF2 response elements and a c-fos minimal promoter (3xMEF2 Luciferase) (3 transfections).

In A, cells were transfected with siCTR or siFus in the presence or absence of a MEF2A expression plasmid (3 transfections).

In B, cells were transfected with expression plasmids for human wild type FUS (hFUS(WT)), human R495X mutant FUS (hFUS(R495X)), human P525L mutant FUS (hFUS(P525L)) or empty plasmid (3 transfections).

In C, cells were transfected with combination of expression plasmids for human wild type FUS (hFUS(WT)), human R495X mutant FUS (hFUS(R495X)) or empty plasmid, in the presence or absence of a MEF2A expression plasmid (3 transfections).

In D, cells were transfected with siCTR or siMef2a in the presence or absence of a hFUS(WT) expression plasmid. Error bars represent SEM. $P < 0.05$, $**P < 0.01$, Student's t-test or ANOVA (3 transfections).

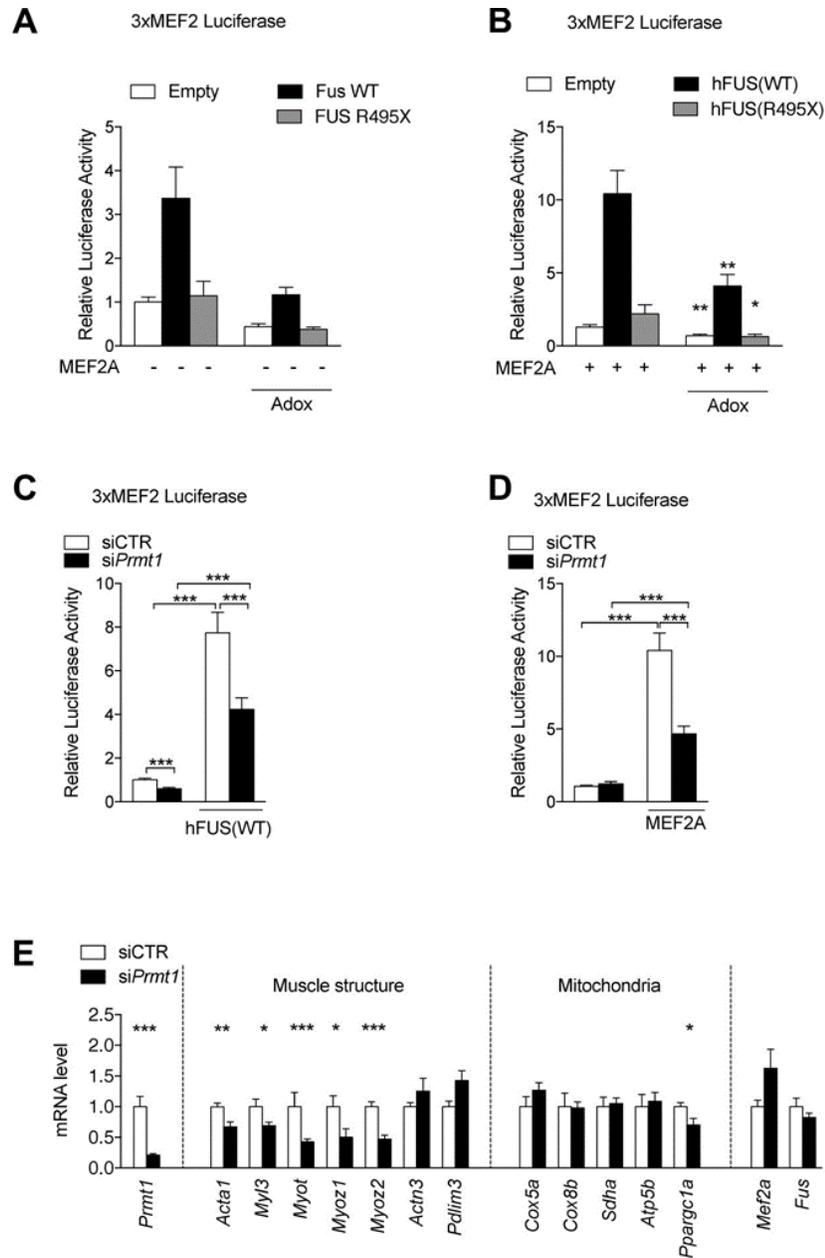


Figure 7: FUS is required for PRMT1-dependent MEF2A activation

A-D: Relative luciferase activity of C2C12 cells transfected with a reporter plasmid including the luciferase ORF under the control of 3 MEF2 response elements and a c-fos minimal promoter (3xMEF2 Luciferase).

In A-B, cells were transfected with expression plasmids for human wild type or R495X mutant FUS (hFUS(WT), hFUS(R495X)) or empty plasmid, in the presence (B) or absence (A) of a MEF2A expression plasmid, and in the presence or absence of AdOx (10 μ M, 24h). In C and D, cells were transfected with siCTR or siPrmt1 in the presence or absence of a hFUS(WT) (C) or MEF2A (D) expression plasmid. E. mRNA levels of identified targets genes in C2C12 cells transfected with siCTR or siPrmt1. Error bars represent SEM. P < 0.05, **P < 0.01, ***p<0,001 Student's t-test, 3 transfections.

Discussion

Discussion

Mon travail de thèse s'est essentiellement focalisé sur la caractérisation du rôle de FUS dans le muscle squelettique. Dans cette discussion, je replacerai les résultats principaux dans le contexte de la SLA.

III. Identification du rôle de FUS dans le muscle

III.1. Rôle de FUS dans la JNM

La SLA est une maladie neurodégénérative affectant globalement des personnes âgées d'une soixantaine d'années. Des formes très sévères de SLA sont causées par la mutation *FUS* qui affecte de jeunes adultes entraînant leur décès en 6 mois à 2 ans après le diagnostic. Notre modèle de souris *Fus* Δ NLS, présentant une troncation de l'exon 15 codant pour la NLS, reproduit partiellement cette sévérité. En effet, les souris homozygotes pour la mutation *Fus* développent une dégénérescence des NM, une taille et un poids plus faible et meurent à la naissance en raison d'une insuffisance respiratoire (Scekic-Zahirovic et al 2016) tandis que les souris *Fus* hétérozygotes survivent jusqu'à l'âge adulte, mais présentent un déficit moteur (Scekic-Zahirovic et al 2017). Le sauvetage de la mutation dans les neurones cholinergiques a montré que le phénotype moteur n'est pas entièrement dépendant de la toxicité de FUS dans les NM puisque des altérations existent aussi dans d'autres types cellulaires, notamment les oligodendrocytes. Dans ces deux premières études, nous ne nous étions pas intéressés aux altérations dans le muscle squelettique. Le rôle de la composante musculaire, dans la SLA, reste controversé en général (Loeffler et al 2016) et était largement inconnu pour les mutations *FUS* au début de mes travaux. Plusieurs études associent une mutation de *FUS* à une altération de la JNM. En effet, une mutation de *Caz*, l'homologue de *Fus* chez la drosophile, cause une diminution du nombre de JNM (Xia et al 2012) ainsi que des défauts de transmissions synaptiques (Machamer et al 2014). De la même façon, le knock-out de *Fus* chez le poisson-zèbre entraîne une altération de la transmission synaptique et une modification du nombre de JNM (Armstrong & Drapeau 2013). De façon plus détaillée, des atteintes au niveau des parties pré- et post-synaptiques ont été reportées. L'étude de So et collaborateurs en 2018 a montré

que la surexpression de FUS sauvage dans les neurones chez la souris entraîne une baisse du nombre de vésicules, l'apparition de mitochondries anormales dans la partie pré-synaptique ainsi qu'une diminution de l'aire des JNM (So et al 2018). L'étude de Sharma et collaborateurs en 2016 a montré dans un modèle murin de SLA-FUS, chez lequel la protéine mutée est exprimée dans les neurones sous le contrôle du promoteur *Mapt*, que cette mutation provoque un grand nombre de troubles fonctionnels. Ils ont reporté une dénervation préférentielle des muscles à contraction rapide, une modification de la morphologie de la JNM, des problèmes de transmission synaptique, une baisse de la densité de vésicules pré-synaptiques mais également l'apparition de mitochondries anormales dans les zones pré- et post-synaptiques (Sharma et al 2016). Ces différentes études suggèrent un rôle de FUS au sein de la JNM. Cependant, à ce stade, de nombreuses questions restaient ouvertes : Comment FUS agit dans la JNM ? Où sont localisés FUS sauvage et les mutants FUS dans la JNM ? Quelle est la conséquence de la mutation dans la partie post-synaptique ? Nous avons montré que FUS WT est présent au sein de la JNM. Plus précisément, dans des conditions physiologiques, FUS est préférentiellement localisée dans les noyaux sous-synaptiques tandis qu'elle est préférentiellement localisée dans les noyaux extra-synaptiques dans des conditions pathologiques. Ces données ne sont pas contradictoires avec l'étude de So et collaborateurs en 2018, qui a détecté une expression de FUS dans la partie pré-synaptique, mais n'a pas étudié l'immunoréactivité dans les noyaux musculaires.

Contrairement à nos attentes, nous n'avons pas détecté d'accumulation cytoplasmique de la protéine FUS mutée dans le muscle squelettique. Ceci pourrait être expliqué par plusieurs hypothèses. Tout d'abord, l'accumulation cytoplasmique pourrait ne pas être détectable dans le muscle, car le volume très important du cytoplasme musculaire diluerait la protéine, la rendant non détectable par immunofluorescence. Une deuxième possibilité pourrait être une spécificité de l'import nucléaire de FUS dans ce tissu. En effet, l'import de FUS dans le noyau dépend à la fois de la NLS et de sa méthylation (Dormann et al 2012, Dormann et al 2010). C'est ce que l'étude de Dormann et collaborateurs a montré en 2012. Le domaine RGG3 non méthylé de FUS est en mesure de se lier à la transportine 1, de façon indépendante de la PY-NLS, pour entraîner l'import nucléaire de FUS. De ce fait, l'étude de la méthylation du mutant FUS dans le muscle

permettrait d'expliquer comment celui-ci entre dans le noyau sans posséder de NLS. On ne peut donc exclure la possibilité que les mécanismes d'import de FUS dans le noyau soient différents entre muscle et neurone, permettant une entrée de FUS dans le noyau sans NLS.

Nous montrons que FUS est enrichie dans la région sous-synaptique, de façon dépendante de l'innervation. Un tel enrichissement suggère que la localisation de FUS est dépendante de signaux dépendants du nerf. Il est notamment possible que la localisation de FUS sous-synaptique soit dépendante de la libération d'agrine par le NM, dont l'implication dans le regroupement des AchR et la transcription de ces récepteurs a déjà été prouvée (Schaeffer et al 2001). Pour cela, l'agrine se lie à son récepteur LRP4-MUSK et active une voie de signalisation dépendante de Rac/cd42. NRG intervient également dans la transcription sous-synaptique en agissant comme un second messenger de l'agrine et Musk, entraînant ensuite la phosphorylation de facteurs de transcription à domaine ETS, dont ERM fait partie. (Hippenmeyer et al 2007). Nos données ne permettent pas de conclure si cet enrichissement sous-synaptique est transcriptionnel ou post-traductionnel. Des études ultérieures sont nécessaires pour y répondre. Il est très intéressant de noter qu'une interaction a été identifiée entre EWSR1, un membre de la famille FET étroitement lié à FUS, et plusieurs facteurs de transcription ETS notamment ERM (Kedage et al 2016). La forte homologie entre FUS et EWSR1 (Schwartz et al 2015) et la localisation sous-synaptique de FUS également dépendante de l'innervation, nous ont conduit à étudier l'interaction entre ces deux protagonistes : FUS et ERM. Nos résultats montrent que FUS interagit avec ERM au niveau protéique, et que les actions de FUS et ERM pour stimuler la transcription des gènes de la JNM sont mutuellement dépendantes. Ceci est cohérent avec nos données d'expression montrant que la mutation de *Fus* diminue l'expression des gènes synaptiques et entraîne une dénervation et une diminution de la taille des JNM chez les souris Δ NLS, hétérozygotes adultes ou homozygotes à la naissance. De façon très intéressante, les souris knock-out *Fus* présentent un phénotype à la JNM, avec une diminution du nombre de clusters d'AchR. Cela dit, ce phénotype n'est pas aussi important que celui observé chez des souris Δ NLS. Ceci suggère que la perte de fonction de FUS est importante. C'est d'ailleurs ce que nous confirmons par siRNA dans les cellules C2C12. Il reste une contribution de type gain de fonction toxique à identifier. Il paraît important de noter ici que

cette observation est en accord avec le gain de fonction toxique de *Fus* observé par Scekcic-Zahirovic et collaborateurs en 2016.

III.2. Rôle de *Fus* dans le muscle

Bien que le rôle de FUS dans le muscle soit très peu décrit, des études ont montré que FUS est présent dans les noyaux des myotubes de patients SLA (Prpar Mihevc et al 2017) et qu'il interagit avec des protéines impliquées dans la structure et la différenciation musculaire. En effet, l'étude de Kamelgarn et collaborateurs en 2016 a montré que FUS interagit avec hnRNPA1 et matrin3, deux RBP associées à la SLA (Johnson et al 2014, Kamelgarn et al 2016, Kim et al 2013) et impliquées dans le développement du muscle (Liu et al 2017, Moloney et al 2016). FUS joue également un rôle dans les épissages alternatifs et la différenciation musculaire grâce à son action sur DUX4 et PTBP1 (Anseau et al 2016, Lin & Tarn 2011, Meissner et al 2003). De façon très intéressante, il a été montré que FUS interagit avec PGC1 α , un régulateur majeur de la fonction mitochondriale (Sanchez-Ramos et al 2011). Nos résultats suggèrent l'importance de cette relation fonctionnelle. En effet, la mutation de FUS diminue l'expression de PGC1 α dans le système nerveux central tandis qu'elle l'augmente dans le muscle (Bayer et al 2017). Cette interaction soulève la question d'un dysfonctionnement mitochondrial dans la SLA liée à FUS.

Il est connu que des altérations de la mitochondrie sont une caractéristique prédominante dans la SLA. En effet, des protéines associées à la SLA tels que SOD1, TDP-43, C9orf72, CHCHD10 ou encore TBK1 sont présents dans la mitochondrie (Cirulli et al 2015, Higgins et al 2002, Lehmer et al 2018, Lopez-Gonzalez et al 2016, Vande Velde et al 2011, Wang et al 2016) et une mutation de ces gènes entraîne une morphologie anormale de celle-ci. Elle est à la fois plus petite, fragmentée et présente des agrégats (Onesto et al 2016, Sasaki & Iwata 2007). Par ailleurs, la densité et les fonctions mitochondriales seront également altérées (Magrane et al 2014). Par exemple, une mutation de SOD1 impacte le transport axonal et l'apoptose (Moller et al 2017, Pedrini et al 2010) tandis qu'une mutation de CHCHd10 est associée à une altération de la respiration mitochondriale (Straub et al 2018). La mitophagie et l'autophagie sont également dérégulées lors de SLA-TBK1, SLA-TDP-43 ou SLA-C9orf72 (Davis et al 2018, Oakes et al 2017, Sellier et al 2016). Enfin, la glycolyse est altérée dans la SLA en réponse aux défauts mitochondriaux induits par une mutation de SOD1 (Menzies et al 2002, Palamiuc et al 2015).

Des études ont montré que FUS est présent dans la mitochondrie et interagit avec des protéines mitochondriales (Chen et al 2016, Deng et al 2015, Sanchez-Ramos et al 2011). De plus, la mutation de Fus cause une anomalie morphologique des mitochondries (Huang et al 2010, Tradewell et al 2012) ainsi qu'une altération de la production d'ATP et de l'absorption du calcium (Stoica et al 2016). Enfin, les fonctions mitochondriales telles que l'autophagie ou le transport axonal sont dérégulés chez les patients souffrant de SLA liée à une mutation de FUS (Baldwin et al 2016, Fiesel & Kahle 2011, Lagier-Tourenne et al 2012, Ryu et al 2014, Soo et al 2015).

Les mutations de FUS ciblent donc la mitochondrie à différents niveaux, cependant son mécanisme d'action reste à éclaircir, et, jusqu'à nos travaux, semble essentiellement provenir d'un gain de fonction de la protéine mutée. Au cours de la thèse, nous avons montré que FUS est requis pour la transcription des cibles du facteur de transcription MEF2, et notamment MEF2A. MEF2 est une famille de facteurs de transcription impliquée dans la myogenèse (Estrella et al 2015, Kaushal et al 1994, Liu et al 2014, Lu et al 2000, Schiaffino et al 2018) et la fonction mitochondriale (Brusco & Haas 2015, Merz & Westermann 2009, Naya et al 2002, Okamoto et al 2002). Plus précisément, des études ont montré que PGC1 α et MEF2 interagissent ensemble pour réguler l'expression des enzymes mitochondriales ainsi que la morphologie des mitochondries (Czubryt et al 2003, Handschin et al 2003). Nos résultats suggèrent que FUS, MEF2a et PGC1 α interfèrent pour réguler l'activité mitochondriale. De plus, nous avons montré que l'effet de FUS sur la stimulation de MEF2A était dépendante de PRMT1, une arginine méthyltransférase impliquée dans la myogenèse (Blanc et al 2017, Iwasaki & Yada 2007, Kim et al 2011), la régénérescence (Blanc et al 2017) et le métabolisme musculaire (An et al 2004, Mostaqul Huq et al 2006, Teyssier et al 2005). PRMT1 est impliquée dans des maladies neuromusculaires (Ljubicic et al 2012) dont la SLA (Dormann et al 2012, Tradewell et al 2012). De plus, des membres de la famille PRMT, ou PRMT1 lui-même, interagissent avec FUS, Mef2 et PGC1 α (Batut et al 2011, Chen et al 2002, Dormann et al 2012, Scaramuzzino et al 2013, Teyssier et al 2005, Tradewell et al 2012). Les détails mécanistiques de cette voie mériteraient d'être étudiés plus précisément.

Notre étude suggère un rôle primordial de FUS dans la régulation des fonctions mitochondriales du muscle. Une dérégulation de ces fonctions, lors de la SLA, pourrait expliquer l'altération de la JNM observée chez les souris *Fus* Δ NLS. En effet, plusieurs études ont montré que la mitochondrie joue un rôle important dans l'assemblage et le maintien de la JNM (Arnold et al 2014, Dupuis et al 2009, Rogers et al 2017).

Notre étude suggère que *Fus* pourrait jouer un rôle plus général dans la physiopathologie des maladies neuromusculaires, en interférant avec les fonctions de MEF2A ou PGC1alpha. De fait, la protéine FUS semble impliquée dans plusieurs maladies affectant le muscle. Une interaction a été caractérisée entre FUS et SMN, la protéine largement impliquée dans l'amyotrophie spinale (Groen et al 2013, Yamazaki et al 2012). FUS est également présente sous forme d'agrégat cytoplasmique dans la maladie de Huntington, une maladie neurodégénérative héréditaire causée par la mutation de la protéine HUNTINGTINE (Doi et al 2008, Kino et al 2016) ainsi que dans les myosites à inclusion (Hernandez Lain et al 2011). Enfin, une augmentation de l'ARNm de *FUS* a été observée chez les patients myasthéniques, c'est-à-dire présentant un défaut de transmission au niveau de la JNM (Barzago et al 2016).

IV. Contribution du muscle dans la SLA

Nos données montrent que FUS joue donc un rôle important dans le muscle et la JNM, et que sa mutation dans la SLA altère la fonction musculaire (fonction mitochondriale et différenciation musculaire). Ceci sous-entend que la toxicité induite par la mutation de *Fus* pourrait être, au moins partiellement d'origine musculaire.

Bien qu'il soit admis que les NM soient impliqués dans le développement de la maladie (Jaarsma et al 2008), la toxicité intrinsèque aux NM ne suffit pas, à elle seule, pour induire la SLA. (Lino et al 2002, Pramatarova et al 2001, Scekcic-Zahirovic et al 2017, Scekcic-Zahirovic et al 2016). D'autres cellules sont impliquées dans la physiopathologie de la SLA, à savoir les astrocytes, microglies, oligodendrocytes et neurones sérotoninergiques (Boillee et al 2006, Dentel et al 2013, El Oussini et al 2016, El Oussini et al 2017, Kang et al 2013, Yamanaka et al 2008).

Concernant le muscle spécifiquement, son implication dans la SLA reste controversée. La diminution de la forme mutée de SOD1 dans le muscle ne ralentit pas la progression de la maladie, ne permet pas de retrouver un nombre normal de myofibres et n'améliore pas la survie des souris SLA (Miller et al 2006, Towne et al 2008). Cependant, la surexpression de la mutation de SOD1, spécifiquement dans le muscle, est suffisante pour créer un dysfonctionnement du métabolisme oxydatif, une atrophie musculaire, une faiblesse musculaire, un déficit moteur, une anomalie des JNM ainsi que la mort des NM (Dobrowolny et al 2008, Wong & Martin 2010). Dans la continuité de ces résultats, l'étude de Shanmukha et collaborateurs en 2018 a montré que l'injection intrathécale (dans l'espace sous-arachnoïdien contenant le liquide céphalo-rachidien) de LCR de patients SLA engendre un désordre musculaire qui pourrait aggraver la pathologie neuronale. Par ailleurs, des traitements ciblant le muscle dans la SLA ont permis de prolonger la survie et d'améliorer les fonctions musculaires (Derave et al 2003, Dupuis et al 2004, Jokic et al 2006, Perez-Garcia & Burden 2012).

Notre étude apporte un argument supplémentaire en faveur d'un rôle actif du muscle dans la SLA. En effet, la restauration de l'expression de la protéine FUS non mutée spécifiquement dans le muscle squelettique permet de rétablir la taille des JNM des souris $Fus^{\Delta NLS/\Delta NLS}$. Par ailleurs, dans une co-culture de NM et de myotubes humains dérivés de patients SLA-FUS, l'expression de la forme mutée de FUS dans les myotubes entraîne un défaut de maturation de la JNM. Cette

altération est potentialisée par la présence conjointe de cette mutation dans les NM et les myotubes. La toxicité de la protéine FUS mutée serait donc liée à une combinaison des toxicités observées à la fois dans le muscle et dans le NM. Ceci est cohérent avec nos résultats qui montrent que rétablir l'expression de FUS non mutée dans le muscle (par MyoD CRE) améliore le phénotype des JNM, mais ne permet pas pour autant d'augmenter la survie des souris, tandis que rétablir l'expression de FUS non mutée dans les NM (par Chat-CRE) empêche leur mort par apoptose, mais ne permet pas d'augmenter la survie des souris. Il serait important de tester si les toxicités des deux types cellulaires combinées sont nécessaires et suffisantes au développement de la SLA-FUS.

Le muscle squelettique pourrait jouer également un rôle dans d'autres maladies du NM telles que l'amyotrophie spinale infantile (SMA) ou l'amyotrophie bulbo-spinale (SBMA). Ainsi SMN, dont la perte provoque la SMA, est requise pour les fonctions musculaires (Cifuentes-Diaz et al 2001, Shafey et al 2005). Sa déplétion dans le muscle altère le transport rétrograde tandis que la réexpression de la forme sauvage de SMN spécifiquement dans le muscle améliore la survie et le poids des souris (Braun et al 1995, Martinez et al 2012). Par ailleurs, un traitement à l'IGF1 dans le muscle améliore la survie et augmente de la taille des myofibres des souris SMA. Le muscle semble également participer à la SBMA, une maladie du NM inférieur causée par une expansion répétitive de CAG dans l'exon 1 codant pour le récepteur aux androgènes (Bosch-Marce et al 2011).

Yu et collaborateurs en 2006 ont montré que l'altération du muscle apparaît avant la dégénérescence des NM tandis que Monks et collaborateurs ont montré que la surexpression du récepteur androgène dans le muscle participe à la pathologie en causant notamment une perte de poids et la mort des NM (Monks et al 2007, Yu et al 2006). Enfin, dans un modèle conditionnel de souris présentant un chromosome bactérien artificiel exprimant les récepteurs androgènes mutants, le croisement avec des souris exprimant de la Cre recombinase sous le contrôle de HSA (Actine squelettique humaine) a permis l'excision de la mutation spécifiquement dans le muscle. Ce sauvetage de la mutation dans le muscle prévient la perte de poids, le déficit moteur, la dégénérescence des NM dans la corne ventrale et améliore la survie (Cortes et al 2014).

Une toxicité intrinsèque au muscle est donc présente dans les maladies du NM et contribuerait à l'apparition de la pathologie. Nos travaux apportent une nouvelle maladie à ces différents exemples, et la SLA-FUS pourrait donc se rapprocher de la SMA et de la SBMA. À ce titre, il est intéressant de noter que les trois protéines impliquées dans ces maladies interagissent au niveau protéique.

V. Une toxicité rétrograde pour le muscle dans la SLA ?

La manière par laquelle la toxicité musculaire pourrait participer au tableau clinique, et notamment à la perte des NM, reste inexpliquée. Il est probable qu'il s'agisse d'une toxicité rétrograde, dite « Dying back », et nos données sont cohérentes avec cette hypothèse. Le mécanisme « dying back » postule une dégénérescence remontant progressivement des terminaisons nerveuses et du muscle jusqu'au corps cellulaire. Celle-ci s'appuie notamment sur l'observation d'une altération précoce du muscle et de la JNM dans la SLA.

Chez les souris SOD1 mutées, une dérégulation de l'expression de plusieurs gènes est observée dans le muscle avant l'apparition des premiers symptômes. C'est le cas de gènes impliqués dans la détoxification, la myogenèse, la formation du cytosquelette ou encore dans la mort cellulaire (Gonzalez de Aguilar et al 2008, Manzano et al 2011). L'étude de Park et collaborateurs en 2008 a également montré qu'un changement de l'activité de CDK5, une protéine impliquée dans la myogenèse, le regroupement des AchR et la transmission synaptique, est présent dans le muscle dès 27 jours chez les souris SOD1^{G93A} alors même que celles-ci ne développent une dégénérescence des NM qu'après 80 jours (Park & Vincent 2008). Une altération de l'activité mitochondriale et une atrophie musculaire ont également été identifiées à un stade précoce de la maladie (Bendotti et al 2001, Luo et al 2013, Marcuzzo et al 2011).

Par ailleurs, la JNM est également atteinte avant les NM. En effet, Fischer et collaborateurs ont montré en 2003 qu'à 47 jours, plus de 40% des JNM sont dénervées chez les souris SOD1^{G93A}. D'autres études ont identifié des problèmes d'assemblage de la JNM, une destruction de celle-ci ainsi que des problèmes de transmission synaptique (Clark et al 2016, Hegedus et al 2007, Pun et al 2006, Rocha et al 2013, Sharma et al 2016).

De façon très intéressante, il a été montré que l'atteinte du muscle impacte la JNM. La surexpression musculaire de NOGO A, une protéine impliquée dans la régénération axonale, provoque une dénervation et une diminution de la taille de la partie post-synaptique (Jokic et al 2006). De plus, un régime riche en graisse augmente la survie et prévient la dénervation en améliorant le phénotype métabolique musculaire des souris SOD1^{G93A} (Dupuis et al 2004). Élaborer un traitement ciblant le muscle empêcherait l'altération de la JNM et bloquerait cette toxicité rétrograde.

Afin d'expliquer le lien entre la dégénérescence des NM et l'altération de la JNM, Parkhouse et collaborateurs en 2008 ont montré qu'une diminution du transport est présente chez les souris $SOD1^{G93A}$ et que cette altération est corrélée à la dénervation (Parkhouse et al 2008). Il est intéressant de noter que ce déficit du transport axonal précède l'apparition des premiers symptômes dans la SLA (Bilsland et al 2010). De plus, l'équipe de Lamonte et collaborateurs en 2002 a montré que l'inhibition du transport axonal provoque la dégénérescence des NM (LaMonte et al 2002), confirmant le lien entre JNM et NM.

De façon plus étendue, plusieurs études ont relié le muscle et les NM. Gonzalez de Aguilar et collaborateurs en 2008 ont montré que des régulations géniques sont communes aux NM et aux muscles. Par exemple, des gènes impliqués dans les dommages oxydatifs (*lox*) ou dans le remodelage de la JNM (*cathepsine*) sont exprimés aussi bien dans le muscle que les NM (Gonzalez de Aguilar et al 2008). Par ailleurs, il a aussi été montré que des défauts mitochondriaux dans le muscle causent la dégénérescence des NM (Dupuis et al 2009). Enfin, la surexpression de la forme mutée de *SOD1* spécifiquement dans le muscle crée une neurodégénérescence (Wong & Martin 2010).

Les travaux que je vous ai présenté dans ce travail de thèse sont cohérents avec un mécanisme « dying back » puisque le muscle, et plus précisément la fonction mitochondriale de celui-ci, est affectée de façon précoce dans nos modèles. L'expression de gènes mitochondriaux est dérégulée dans le tibialis tandis que les JNM sont déjà partiellement dénervées chez les *Fus* ^{$\Delta NLS/+$} . À partir de 1 mois, la morphologie de la jonction neuromusculaire est altérée et une dénervation est présente chez les souris *Fus* ^{$\Delta NLS/+$} . À 10 mois, la force musculaire, mesurée par test d'agrippement et de grille inversée, est diminuée tandis que la locomotion n'est altérée qu'à 22 mois, en même temps que la dégénérescence des NM (Scekic-Zahirovic et al 2017). La toxicité induite par la mutation de *Fus* dans le modèle *Fus* ΔNLS semble donc suivre un mécanisme rétrograde aboutissant à la perte de NM. Il n'en reste pas moins que ces données sont corrélatives, et qu'il faudra étudier les conséquences d'une restauration de la pleine fonction de *FUS* au niveau musculaire et/ou motoneuronal chez les animaux présentant une mutation hétérozygote pour conclure sur les relations de causalité.

Phénotype	Ages	Ages		
		1 mois	10 mois	22 mois
Atteinte mitochondriale		Altération	Altération	Altération
Taille de la JNM		Altération	Altération	Altération
Dénervation		Altération	Altération	Altération
Force musculaire		En cours	Altération	Altération
Locomotion		En cours	Pas d'altération	Altération
Dégénérescence des NM		Pas d'altération	Pas d'altération	Altération

Figure 30 : La toxicité présente chez les souris $Fus^{\Delta NLS/+}$ suit un profil de « dying back »
 Les études du laboratoire ont montré que la mutation de FUS affecte en premier lieu le muscle entraînant une atteinte de la mitochondrie et de la jonction neuromusculaire (JNM) dès 1 mois tandis que les neurones moteurs (NM) ne sont affectés qu'à 22mois. Le phénotype des souris $Fus^{\Delta NLS/+}$ observé à 1, 10 et 22mois suggèrent donc un mécanisme pathologique rétrograde dans la SLA.

VI. Identification d'un nouveau mécanisme pour les RBP

La forme familiale de la SLA est causée par des mutations dans de nombreux gènes notamment des gènes codants pour des RBP. Parmi ces RBP, on retrouve FUS, TDP-43, TAF15, EWSR1, hnRNPA2B1, hnRNPA1 ou encore matrin-3, étant toutes impliquées dans des défauts du métabolisme de l'ARN dans la SLA (Ling et al 2013, Taylor et al 2016).

En dehors de FUS, TDP-43 est la seule autre RBP associée à la SLA présentant un rôle au sein de la **JNM**. L'étude de Feiguin et collaborateurs en 2009 a montré que des drosophiles, possédant une mutation TDP-43, reproduisent la SLA et plus particulièrement présentent un défaut de la JNM. Ces drosophiles ont une partie pré-synaptique moins complexe (Feiguin et al 2009). Chez des drosophiles KO TDP-43, une atteinte pré-synaptique à savoir une baisse protéique des vésicules synaptiques est également retrouvée (Romano et al 2014). Plusieurs études décrivent ensuite une atteinte de la partie post-synaptique de la JNM. Romano et collaborateurs, en 2014, ont montré une baisse de l'intensité des regroupements post-synaptiques, tandis que Godena et collaborateurs en 2011 ont identifié des problèmes de croissance et une baisse du nombre de JNM (Godena et al 2011, Romano et al 2014). Cette altération de la partie post-synaptique de la JNM peut être expliquée par des problèmes de transmission synaptique. Dzieciolowska et collaborateurs en 2017 ont montré que le knock-out de pour la protéine TDP-43 chez le poisson-zèbre augmente la quantité d'Ach libérée dans la fente synaptique tandis que Chand et collaborateurs, en 2018, ont montré un défaut de transmission synaptique chez des souris SLA-TDP-43 (Chand et al 2018, Dzieciolowska et al 2017). L'ensemble de la JNM est donc dérégulée en réponse à une mutation de TDP-43, cependant le mécanisme d'action reste à éclaircir.

Contrairement à la JNM, le rôle des RBP dans le muscle a été plus caractérisé. Par exemple, il a été montré que MATRIN 3 régule les ARNs musculaires (Banerjee et al 2017). Plusieurs études ont également associé des défauts mitochondriaux à des mutations de RBP dans la SLA. L'étude d'Altanbyek et collaborateurs en 2016 a montré que FUS, TDP-43 et TAF15 augmentent la fragmentation de la mitochondrie et diminuent l'expression de MARF, une protéine impliquée dans fusion mitochondriale (Altanbyek et al 2016). Par ailleurs, la mutation de TDP-43 dans la SLA entraîne également un défaut de la morphologie et du transport mitochondrial (Magrane et al 2014). Enfin, l'étude de Park et collaborateurs a montré que la perte d'EWSR1 entraîne une

dégradation de PGC1 α associée à une altération de la stabilité et l'homéostasie mitochondriale (Park et al 2015). En effet, la perte d'EWSR1 provoque des anomalies dans la structure de la mitochondrie ainsi qu'une diminution de l'ADN et de la densité mitochondriale. La fonction mitochondriale est également dérégulée suite à une diminution de l'expression de plusieurs gènes mitochondriaux (cox7a, cox8b et Tfam).

Les RBP sont donc à l'origine d'une dysfonction musculaire via leur rôle au sein de la mitochondrie, mais aussi via leur implication dans le développement musculaire. Par exemple, EWSR1 interagit avec PAX7, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation du muscle (Charville et al 2017) et TDP-43 régule les microARN-1 et 206 impliqués dans la myogenèse (King et al 2014). L'étude de Liu et collaborateurs, quant à elle, montre que le knock-out de hnRNPA1 induit un défaut développemental musculaire (Liu et al 2017). L'absence de hnRNPA1 augmente la taille des myofibres dans le cœur alors qu'elle la diminue dans la langue et le diaphragme. Enfin, une dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans le développement et la contraction musculaire a été mise en évidence.

Les mutations ciblant les RBP sont donc associées à des maladies à fortes composantes musculaires telles que des myopathies (Kraya et al 2015, Senderek et al 2009), des dystrophies musculaires (Bengoechea et al 2015), des myosites à inclusions associées ou non à des démences et maladie de Paget (Cortese et al 2014, Custer et al 2010, D'Agostino et al 2011, Hernandez Lain et al 2011, Kim et al 2013, Salajegheh et al 2009, Yamashita et al 2013), des syndromes de tremblements-ataxies liés à une prémutation de l'X fragile (He et al 2014, Iwahashi et al 2006, Sofola et al 2007), des SMA (Mirra et al 2017, Yamazaki et al 2012), ou encore des DFT associées à des SLA-FUS (Neumann et al 2009b, Neumann et al 2009c, Neumann et al 2006).

Bien qu'un nombre grandissant d'études suggèrent un rôle des RBP au sein du muscle et des maladies musculaires, notre étude est actuellement la première à montrer le rôle d'une RBP dans l'assemblage de la JNM et la transcription des AchR. De plus, le mécanisme d'action, que nous avons identifié, impliquant FUS dans les fonctions mitochondriales, pourrait s'étendre à ces autres RBP expliquant ainsi l'effet délétère de leur mutation dans la mitochondrie.

VII. Rôle de Fus dans les synapses cholinergiques

Au-delà du muscle squelettique, nos données suggèrent une fonction de FUS dans la régulation post-synaptique de la transcription et plus particulièrement dans les synapses cholinergiques, comme la JNM. L'Ach est un neurotransmetteur exprimé aussi bien dans le système nerveux central que périphérique. Les voies de signalisation impliquant l'Ach sont réalisées grâce à des projections neuronales et des interneurons. Les neurones cholinergiques sont majoritairement localisés dans le prosencéphale basal et projettent dans le cortex (Fibiger 1982, Wallace & Bertrand 2013). En 2014, Bloem et collaborateurs ont montré que quatre voies cholinergiques relient le prosencéphale basal au cortex via les couches I et IV (Bloem et al 2014). Une deuxième source de projection cholinergique se situe dans le tronc cérébral et innerve le thalamus, le cervelet ou encore la moelle épinière. Enfin, le striatum possède également des interneurons cholinergiques (de Lacalle et al 1993, Heckers et al 1992, Mesulam et al 1992).

Dans la SLA, des études ont mis en évidence une dysfonction synaptique (Casas et al 2016, Ikemoto et al 2002) cependant l'altération cholinergique n'a été étudiée que partiellement. Notre étude a mis en avant un rôle de Fus sur les AchR de la JNM et d'autres équipes ont également décrit une altération de la JNM dans la SLA (Cappello & Francolini 2017). En dehors de la JNM, la pathologie cholinergique est peu décrite. Une perte des neurones cholinergiques a été identifiée chez le patient (Crochemore et al 2005, Nagao et al 1998) ainsi qu'une perte de l'activité de la choline acétyltransférase (ChAT), l'enzyme responsable de la synthèse de l'Ach (Casas et al 2013, Crochemore et al 2005, Kato 1989). Il est intéressant de noter que l'acétylcholinestérase, l'enzyme cette fois-ci responsable de la dégradation de l'Ach, est également dérégulée dans la SLA (Campanari et al 2016). En 2009, l'étude de Tateno et collaborateurs a montré qu'à un stade présymptomatique, les souris SOD1^{G93A} présentent une baisse du transport axonal de ChAT et une altération de la libération d'Ach par les microtubules (Tateno et al 2009). Plus récemment, Milan et collaborateurs ont montré que la partie terminale large des synapses cholinergiques, appelée bouton-C, présente une morphologie anormale dans les NM des souris SOD1^{G93A} à un âge pré-symptomatique (Milan et al 2015). De plus, les interneurons cholinergiques de la lamina X sont plus abondant dans les segments lombaires supérieurs chez les souris SOD1 que chez les souris WT.

Par ailleurs, le rôle de l'Ach dans la régulation de l'attention n'est plus à prouver, or nos souris ainsi que les patients SLA présentent des troubles exécutifs et des troubles de l'attention (Bailey et al 2012, Bailey et al 2010, Goldstein et al 2011, Guillem et al 2011, Lomen-Hoerth et al 2003, Merrilees et al 2010). De fait, nos souris FUS-SLA possèdent également des problèmes de mémorisation à long terme, observés par un test de piscine de Morris. Ceci est associé à une dégénérescence des neurones cholinergiques centraux (Scekic-Zahirovic & Sanjuan Ruiz, en préparation). Ces résultats suggèrent que nos souris pourraient également présenter un trouble cholinergique qui contribuerait à leur phénotype central.

De façon plus générale, il a été montré qu'une dysfonction cholinergique provoque des troubles cognitifs, comportementaux et moteurs (Miles et al 2007, Zagoraïou et al 2009). Par exemple, l'étude de Bertuzzi et collaborateurs en 2018 a montré que l'activation des récepteurs muscariniques de l'Ach contrôle la locomotion et peut altérer l'excitabilité des NM (Bertuzzi & Ampatzis 2018). Ce déficit cholinergique a été mis en évidence dans plusieurs maladies dégénératives, à savoir Huntington, Alzheimer, Parkinson et plusieurs types de démences.

En 2006, l'étude de Smith et collaborateurs a montré que la transmission synaptique est altérée dans un modèle de souris transgénique de la maladie de Huntington. Ceci est associé à une diminution de la protéine et de l'ARNm des transporteurs de l'Ach et de la ChAT dans le striatum et le cortex. Ces auteurs ont aussi détecté une diminution de l'activité de l'AchE dans le striatum (Smith et al 2006).

Dans la maladie d'Alzheimer, une déplétion du nombre de neurones cholinergiques dans les axones corticaux a été observée. De plus, plusieurs études ont montré une dérégulation de l'innervation cholinergique associée à une baisse de l'activité de l'AchE dans le cortex et une augmentation paradoxale de la ChAT (Mesulam et al 2004, Mesulam 2013).

Une dérégulation de l'activité de l'AchE est également retrouvée dans la maladie de Parkinson ainsi que des défauts de transmission synaptique, une dénervation et une atrophie du proencéphale basal. Par ailleurs, des traitements avec des anti-cholinergiques ont été utilisés dans la maladie de Parkinson et ont montré une amélioration des symptômes (Bohnen & Albin 2011, Bosboom et al 2003, Perez-Lloret & Barrantes 2016).

Enfin, le système cholinergique semble être impliqué dans les démences à corps de Lewy et les démences vasculaires. En effet, une perte de neurones cholinergiques accompagnée d'une réduction de l'activité de l'Ach a été observée dans le cortex, l'hippocampe, le striatum et liquide cébrospinal de patients atteints de démences vasculaires. De façon complémentaire, une baisse de l'activité de la ChAT a été observée dans l'hypothalamus et le cortex de ces patients (Wang et al 2009).

Le rôle de FUS sur les AchR et les évidences d'un dysfonctionnement cholinergiques au sein des maladies neurodégénératives suggèrent une étude approfondie de la voie cholinergique en vue de l'élaboration d'un traitement thérapeutique du phénotype moteur et cognitif retrouvé dans la SLA. Ce phénotype pourrait aussi sous-tendre les DFT liées aux mutations FUS, mais là encore, des études complémentaires sont nécessaires.

Conclusion

Conclusion

Les altérations musculaires telles qu'un stress oxydant, un dysfonctionnement mitochondrial et une dégénérescence musculaire (atrophie, fragmentation des mitochondries, réduction des niveaux calciques, dérégulation de l'autophagie) sont caractéristiques de la SLA. Cependant, malgré l'évidence d'une toxicité extrinsèque aux neurones moteurs, la contribution du muscle dans la pathologie reste à démontrer.

Nos travaux ont permis d'identifier deux fonctions de FUS dans le muscle squelettique. Au sein de la JNM, FUS est enrichie dans les noyaux sous-synaptiques et cette localisation est dépendante de l'état d'innervation du muscle. Dans les noyaux sous-synaptiques, FUS interagit avec ERM pour assurer la transcription des gènes codant pour les AchR. De ce fait, chez les souris *Fus*^{ΔNLS/+}, la dénervation est associée à une délocalisation de FUS dans les noyaux extra-synaptiques et des défauts morphologiques dans la partie post-synaptique de la JNM.

FUS est également impliquée dans les fonctions musculaires extra-synaptiques. Nous avons montré que FUS est requise pour la fonction mitochondriale et la différenciation musculaire. En effet, chez les souris *Fus*^{ΔNLS/+}, une altération de la morphologie ainsi qu'une baisse de l'expression des gènes mitochondriaux et de l'activité mitochondriale a été observée. De plus, les myofibrilles et le réticulum sarcoplasmique sont altérés suite à la mutation de *Fus*. Ce phénotype est dépendant de MEF2A et PRMT1, deux protéines impliquées dans la myogenèse et l'activité de la mitochondrie. En effet, nous avons montré que l'activation de MEF2A induite par FUS est dépendante de PRMT1.

Les détails mécanistiques restent à préciser, notamment en étudiant une potentielle relation avec PGC1 α , un co-activateur transcriptionnel impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique. Ces données peuvent être pertinentes pour les SLA et DFT liées à FUS, mais aussi pour un certain nombre de maladies neuromusculaires liées à des protéines proches de FUS.

Afin d'évaluer directement la contribution de l'expression musculaire de la mutation de FUS, nous avons croisé les souris *Fus* Δ NLS avec des souris exprimant la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur musculaire MyoD. Nous avons pu montrer que la mutation de *Fus* est sauvée spécifiquement dans le muscle. Plus important, la restauration de l'expression normale

de FUS dans le muscle est suffisante pour rétablir l'aire de la JNM, qui retrouve une surface identique à celle observée chez les souris sauvages. Par ailleurs, nous avons observé l'impacte de la surexpression de FUS sauvage ou mutée dans des co-cultures de cellules iPS de patients SLA dérivées en neurones moteurs et en cellules musculaires. Ces études ont montré que la mutation de FUS spécifiquement dans le muscle ou les neurones moteurs entraîne une altération de la JNM. La mutation de *Fus* exerce donc ses effets toxiques sur la JNM au moins en partie via son expression musculaire. Ces données apportent donc un argument important en faveur d'une contribution d'une toxicité musculaire à la SLA.

Annexes

Annexes

Durant ma thèse, j'ai eu la chance de pouvoir collaborer avec Hajer El oussini et travailler sur son projet de thèse consistant à étudier le rôle des neurones sérotoninergiques dans la SLA. En effet, une perte de ces neurones est observée à un stade final de la pathologie cependant leur rôle reste à identifier.

Pour cela, nous avons utilisés un modèle murin conditionnel présentant la mutation SOD1 G37R. Nous avons ensuite restauré l'expression normale de SOD1 dans les neurones sérotoninergiques en croisant les souris SOD1 G37R avec des souris surexprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur Tph2.

Les neurones serotoninergiques sont alors préservés chez les souris G37R^{ΔTph2} entraînant une diminution de la spasticité. De façon très intéressante, nous avons montré que la diminution de la spasticité accélère la paralysie mais ne modifie pas la survie de ces souris. Les neurones sérotoninergique sont donc indispensables à l'apparition de la spasticité dans la SLA et représenteraient donc une cible thérapeutique intéressante.

Dans ce projet, mon rôle a consisté à maintenir la lignée de souris SOD1 G37R et générer les souris nécessaires à l'étude. Par ailleurs, j'ai également réalisé des extractions d'ARN, RT et qPCR.

Degeneration of Serotonin Neurons Triggers Spasticity in Amyotrophic Lateral Sclerosis

Hajer El Oussini, PhD,^{1,2} Jelena Scekcic-Zahirovic, MD, PhD,^{1,2}

Pauline Vercruysse, PhD,^{1,2,3} Christine Marques, PhD,^{1,2}

Sylvie Dirrig-Grosch, PhD,^{1,2} Stéphane Dieterlé, BSc,^{1,2} Gina Picchiarelli, MSc,^{1,2}

Jérôme Sinniger, BSc,^{1,2} Caroline Rouaux, PhD,^{1,2} and Luc Dupuis, PhD^{1,2}

Objective: Spasticity occurs in a wide range of neurological diseases, including neurodegenerative diseases, after trauma, and after stroke, and is characterized by increased reflexes leading to muscle hypertonia. Spasticity is a painful symptom and can severely restrict everyday life, but might also participate in maintaining a low level of motor function in severely impaired patients. Constitutive activity of the serotonin receptors 5-HT_{2B/C} is required for the development of spasticity after spinal cord injury and during amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We sought here to provide direct evidence for a role of brainstem serotonin neurons in spasticity.

Methods: *SOD1(G37R)* mice expressing a conditional allele of an ALS-linked *SOD1* mutation were crossed with Tph2-Cre mice expressing Cre in serotonergic neurons. Measurement of long-lasting reflex using electromyography, behavioral follow-up, and histological techniques was used to characterize spasticity and motor phenotype.

Results: Deleting mutant *SOD1* expression selectively in brainstem serotonin neurons was sufficient to rescue loss of TPH2 immunoreactivity and largely preserve serotonin innervation of motor neurons in the spinal cord. Furthermore, this abrogated constitutive activity of 5-HT_{2B/C} receptors and abolished spasticity in end-stage mice. Consistent with spasticity mitigating motor symptoms, selective deletion worsened motor function and accelerated the onset of paralysis.

Interpretation: Degeneration of serotonin neurons is necessary to trigger spasticity through the 5-HT_{2B/C} receptor. The wide range of drugs targeting the serotonergic system could be useful to treat spasticity in neurological diseases.

ANN NEUROL 2017;82:444–456

Spasticity occurs in a wide range of neurological diseases, including neurodegenerative diseases (eg, amyotrophic lateral sclerosis [ALS] or multiple sclerosis), genetic diseases (eg, hereditary spastic paraplegia), and trauma (eg, spinal cord injury [SCI]), and after stroke. Spasticity is usually defined as an exaggerated stretch reflex leading to muscle hypertonia, yet includes also more general hyper-reflexia and/or clonus.^{1–4} Spasticity is a painful symptom and can severely restrict everyday life, but might also participate in maintaining a low level of motor function in severely impaired patients.

A number of mechanisms have been shown to participate in the development of spasticity after spinal cord injury. First, hyperreflexia might arise from increased synaptic input to motor neurons caused by remodeling of a number of spinal pathways including sensory afferents or Renshaw cells.^{2,3} More recently, spasticity was shown to result, at least in part, from increased excitability of motor neurons themselves leading to more sustained contractions in response to a sensory stimulus after SCI.^{2,5–7} Such SCI-induced motor neuron hyperexcitability has been postulated to occur through brain-derived

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/ana.25030

Received May 10, 2017, and in revised form Aug 22, 2017. Accepted for publication Aug 24, 2017.

Address correspondence to Dr Dupuis, Inserm UMR-S1118, Faculté de médecine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg cedex, France.
E-mail: ldupuis@unistra.fr

We thank Dr D. W. Cleveland for providing *SOD1(G37R)* mice.

From the ¹Faculty of medicine, Inserm UMR-S1118, France; ²Fédération de médecine translationnelle, Université de Strasbourg, France; and ³Department of Neurology, University of Ulm, Ulm, Germany

neurotrophic factor–dependent downregulation of KCC2, a potassium-chloride cotransporter responsible for chloride extrusion in adult neurons.⁸ Alternatively, motor neuron hyperexcitability could be a late consequence of the deprivation of monoaminergic input to the motor neuron. Ligand-independent activity of serotonin (5-HT_{2B/C}) and norepinephrine (α 1) receptors could be responsible for the development of spastic long-lasting reflexes (LLRs)^{9–11} and the maintenance of locomotion after partial SCI.^{9,12} The sequence of events as well as their relative importance in the development of spasticity remain, however, elusive.

Spasticity also occurs in ALS, yet, contrary to SCI, ALS-associated spasticity has barely been studied. Spasticity in ALS is paradigmatically considered to result from the degeneration of upper motor neurons (UMNs).^{13,14} UMNs are glutamatergic neurons located in layer V of the motor cortex, project to spinal motor neurons through the corticospinal tract, and are the major source of descending motor commands for voluntary movement.¹⁵ Although there is a consensus to causally link spasticity to UMN degeneration in ALS, this question has, to our knowledge, not been addressed experimentally. We have recently shown that brainstem serotonin neurons degenerate in ALS mouse models and in ALS patients, and inverse agonists of the 5-HT_{2B/C} receptors were potently antispastic in ALS mice.¹⁶ This raised the possibility that degeneration of serotonin neurons could, at least in part, be involved in the development of ALS-associated spasticity.

Here, we took advantage of the existence of a conditional mouse model of ALS¹⁷ to investigate the role of serotonin neurons in ALS-related spasticity. We show that serotonin neuron degeneration is required for both the development of spasticity and the constitutive activity of the 5-HT_{2B/C} receptors. These findings have 2 major consequences. First, they provide genetic evidence that targeting the serotonin neurons should prove useful in treating this disabling symptom. Second, they demonstrate that a large part of the symptoms typically attributed to UMN degeneration in ALS may rather arise from the degeneration of another neuronal type.

Materials and Methods

Animals

Transgenic mice were housed in the animal facility of the medicine faculty of Strasbourg University, with 12/12 hours of light/dark and unrestricted access to food and water. In all experiments, littermates were used for comparison. Transgenic mice carrying a floxed *SOD1*(G37R) human transgene on a C57BL/6 background were kindly provided by Dr Don W. Cleveland.¹⁷ These mice carry a 12kb genomic DNA fragment

encoding the human *SOD1*(G37R) transgene, under its endogenous promoter, flanked by loxP sequences and were used as heterozygous, with their nontransgenic littermates as controls. Onset of symptoms was defined according to previous studies.¹⁷ Tph2-iCreER (referred to as *Tph2*-Cre) transgenic mice (Jax strain #016854) expressing a tamoxifen-inducible Cre recombinase under the control of mouse *Tph2* promoter were genotyped with their nontransgenic littermates on a C57BL/6 background. R26-stop-EYFP mice (Jax strain #006148) carrying a loxP-flanked STOP sequence followed by the enhanced yellow fluorescent protein gene (*EYFP*) inserted into the Gt(ROSA)26Sor locus were used as YFP Cre reporter mice.

Tph2-Cre mice were crossed with R26-Stop-EYFP mice to obtain double transgenic mice in F1 generation. *SOD1*(G37R) mice were crossed with *Tph2*-Cre mice to obtain double transgenic mice in F1. Mice single transgenic for the *SOD1*(G37R) transgene (referred to as G37R) were compared with littermate double transgenic mice carrying both *SOD1*(G37R) transgene and *Tph2*-Cre transgene (referred to as G37R^{ΔTph2}). Mice negative for *SOD1*(G37R) transgene were used as controls (wild-type [Wt]). Both male and female mice were used, and groups were gender balanced.

All animal experimentations were performed in accordance with institutional guidelines, and protocols were approved by the local ethical committee from Strasbourg University (CREMEAS) under number AL/29/36/02/13 in accordance with European regulations.

Recombination in Serotonin Neurons

With mice at 56 days of age, 100 μ l of tamoxifen/corn oil solution at a dose of 75mg/kg body weight was administered through oral forced feeding during 5 consecutive days. All mice in this study, whatever their genotype, were given tamoxifen at 56 days of age to avoid a possible confounding effect of tamoxifen injection. Double transgenic *Tph2*-Cre/R26-Stop-EYFP mice were sacrificed 1 month after induction of recombination, and tissues were processed for histology (n = 5). Negative controls included littermate single R26-Stop-EYFP mice (n = 5) that did not show YFP staining in TPH2-positive neurons (data not shown).

A cohort of 7 G37R mice, 7 G37R^{ΔTph2} mice, and 7 Wt mice, independent from the major behavior cohort, was administered tamoxifen and sacrificed 1 month after induction of recombination for microdissection of brain and brainstem regions.

Characterization of Mouse Motor Behavior and Survival

A cohort of 14 G37R, 15 G37R^{ΔTph2}, and 15 Wt mice was bred and longitudinally followed. These mice were visually inspected daily and weekly monitored for body weight and motor symptoms from 2 months of age until end stage of the disease by a nonblinded observer. To evaluate muscle strength, we used a grip meter test (Bioseb, Vitrolles, France; ALG01). The muscle force (in Newtons) was measured 3 times per week per mouse. Results are the mean of 2-week sessions. Disease

course and survival were assessed daily by visual inspection. Disease onset was calculated as time of peak of body weight. Disease duration was the time between the peak of body weight and death. After disease onset, mice were followed daily and end stage was defined by full paralysis and when mice were unable to return after 10 seconds placed on the back. End-stage mice underwent electromyography (EMG) for quantification of spasticity ($n = 13$ for G37R and $n = 12$ for G37R^{ΔTPH2}) and were then immediately euthanized. Tissues of these mice were processed for histology ($n = 5$) or for molecular biology ($n = 8$ for G37R and $n = 7$ for G37R^{ΔTPH2}). Among these groups, 1 G37R mouse and 3 G37R^{ΔTPH2} mice died abruptly overnight and could not be included in these analyses.

Histological Procedures

Tissues were dissected and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer pH 7.4 overnight. Brain and brainstem tissues were sectioned at 40 μm thickness using vibratome and processed as floating sections. Spinal cord was dissected out of the vertebral column, cryoprotected in 30% sucrose, embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, the Netherlands; O.C.T. Compound, #4583), frozen in melting isopentane, and cut in 16 μm cryosections (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany; CM 3050S). The L3–L5 region of the spinal cord was used, as identified according to previous studies.¹⁸

Antibodies used were: anti-choline acetyl transferase (ChAT; Millipore, Billerica, MA; AB144-P, diluted 1:50), anti-TPH2 (Abcam, Cambridge, MA; ab121013, diluted 1:500), antihuman SOD1 (Abcam, ab52950, diluted 1:100), anti-Iba1 (Abcam, ab5076, diluted 1:100), anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; Dako Cytomation, Carpinteria, CA; Z0334, diluted 1:500), anti-green fluorescent protein (GFP; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; A-11122, diluted 1:1,000), and antiseroitonin (Millipore, MAB352, diluted 1:1,000). For immunohistochemistry, secondary antibodies were donkey biotinylated antibodies from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA) and staining was revealed using avidin–biotin complex immunoperoxidase technique (VECTASTAIN ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). For immunofluorescence, fluorescent secondary antibodies used were donkey, Alexa Fluor 488, or Alexa Fluor 594 coupled antibodies from Life Technologies (Carlsbad, CA).

For confocal imaging, single-layer images or Z-stack images (0.5 μm optical section) were acquired using a laser-scanning microscope (confocal Leica Microsystems SP5) equipped with a ×63 oil objective (NA1.4). Excitation wavelengths were sequentially argon laser 488nm, diode 561nm, and helium neon laser 633nm. Emission bandwidths are 500 to 550nm for Alexa Fluor 488, 570 to 620nm for Alexa Fluor 594, and 650 to 750nm for DRAQ5.

Quantification of Motor Neurons

Motor neuron counting was performed in L3–L5 ventral horn in every 10th section for 10 sections in total per animal (160 μm thick in total, spread over 1.6mm). Only ChAT-

positive neurons located in a position congruent with that of motoneuron groups were counted.¹⁹ All ChAT-positive profiles located in the ventral horns of immunostained sections and clearly displayed in the plane of section were counted. Total estimated motor neuron numbers were obtained using a computer-assisted microscope (Eclipse E800; Nikon, Tokyo, Japan) and associated software (NIS Elements v4.0). Total numbers of motoneurons and the mean area of individual cells were obtained using ImageJ freeware (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) after image acquisition at ×20 under the same exposition parameters with a digital camera (Nikon Digital Sight DS-U3). The observer was blinded to the genotype of studied mice.

Quantification of TPH2 Immunoreactivity

For TPH2-positive neurons quantification in the brainstem, we used a previously described protocol.^{16,20} At least 3 sections per region were selected and anatomically matched. We selected sections comprising raphe dorsal, median raphe, and raphe magnus nuclei according to the Paxinos atlas. Acquired images at ×20 under the same exposition parameters with a digital camera (Nikon Digital Sight DS-U3) were taken in specific regions. Total mean area of individual cells was obtained using ImageJ freeware (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The observer was blinded to the genotype of studied mice.

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from the spinal cord of end-stage mice using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA was reverse transcribed using 1 μg of RNA and the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA). We performed real-time polymerase chain reaction (PCR) using IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), and data were normalized with GeNorm software.²¹ Two standard genes (Tata-box binding protein [*TBP*] and RNA polymerase 2 subunit [*Pol II*]) were used. Quantitative PCR was performed on a CFX96 Real-time System (Bio-Rad) using iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad). Relative mRNA levels were calculated with Bio-Rad CFX Manager 3.1 using $\Delta\Delta C_t$ method. We used the following oligonucleotide primers for quantitative PCR: *Tph2*, 5'-GAGCTTGATGCCG ACCAT-3' and 5'-TGGCCACATCCACAAAATAC-3'; *hSOD1*, 5'-CACTGGTGGTCCATGAAAAAGC-3' and 5'-ACACCAC AAGCCAAACGACT-3'; *Gfap*, 5'-AGAAAACCGCATCACC ATTC-3' and 5'-TCACATCACCACGTCCTTGT-3'; *Iba1*, 5'-AGCTTTTGGACTGCTGAAGG-3' and 5'-CAGCTCTAGG TGGGTCTTGG-3'.

Electromyographical Evaluation of Tail Spasticity

LLR was determined and quantitated as previously described.¹⁶ Briefly, tail muscle spasticity was performed with percutaneous EMG wires inserted in segmental tail muscles as described for rats.²² Paralyzed mice were kept in a chamber during the recording with the tail free to move. During EMG recording, muscle spasms were evoked with mechanical stimulation of the tail. EMG was sampled at 5kHz (0.2mV/s per division). For

quantification, we measured LLR signal-to-noise ratio intensity by a standardized rectangle that was drawn before and after (>1 second) mechanical stimulation. The signal intensity ratio relative to background was calculated using the pixel classifier algorithm of Nikon Nis-element 3.10 SP3 software, using the intensity profile measurement function. The raw signal was obtained by deducing the noise before mechanical stimulation. Three EMG signal recordings per animal were quantified. For signal processing, only positive amplitude values were analyzed. Maximal amplitude threshold measurements were obtained from LLR signal upon mechanical stimulation. For each EMG signal recording, the maximum amplitude of LLR was determined. These experiments were performed blinded to the genotype.

Statistical Analysis

All data are presented as mean \pm standard error of the mean. All differences were considered significant at $p < 0.05$. Comparison of discrete values for 2 groups was performed using Mann–Whitney test. Comparison of discrete values for >2 groups was performed using Kruskal–Wallis followed Dunn correction. For survival and disease onset analysis, animals were evaluated using log-rank (Mantel–Cox) test. For repeated measurements, a repeated measures 2-way analysis of variance was performed to test the effect of age and genotype. Fisher exact test was used for contingency analysis. All analyses were performed using Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Results

Targeting Mutant SOD1 Expression in Adult Serotonergic Neurons

Tph2-Cre mice express Cre-ERT2 upon the control of the *Tph2* promoter, enabling Cre-mediated recombination in serotonergic neurons after tamoxifen administration. To control for the efficiency and selectivity of the *Tph2*-Cre transgene, we crossed *Tph2*-Cre mice with Rosa26 STOP EYFP (YFP Cre reporter) mice, which express YFP only after Cre-mediated recombination. This led to robust GFP immunoreactivity 1 month after tamoxifen treatment in virtually all TPH2-positive neurons in the brainstem in double *Tph2*-Cre/YFP Cre reporter mice (Fig 1). Contrastingly, GFP was not detected in cholinergic neurons nor in microglial cells. Thus, the *Tph2*-Cre transgene allows inducing selective Cre-mediated recombination in brainstem serotonin neurons upon tamoxifen injection. To determine the role of serotonergic neurons in ALS, we used floxed *SOD1*(G37R) mice, which express the ALS-linked G37R mutation in the human *SOD1* gene that can be excised through Cre-mediated recombination.¹⁷ These mice have been widely used to determine the respective roles of motor neurons, microglia, astrocytes, or oligodendrocytes in ALS phenotypes.^{17,23–26} *SOD1*(G37R) mice were then crossed with *Tph2*-Cre mice, and all mice from the F1

generation, whether or not carrying the *Tph2*-Cre transgene, were given tamoxifen at 56 days of age. Transgenic *SOD1*(G37R) mice carrying the *Tph2*-Cre transgene are denoted as G37R^{ΔTph2} mice, whereas littermate *SOD1*(G37R) mice without the *Tph2*-Cre transgene are denoted as G37R mice. Expression of *SOD1*(G37R) was decreased in microdissected raphe magnus nucleus but not in cortex or cerebellum of G37R^{ΔTph2} mice as compared with their G37R littermates 1 month after tamoxifen administration. Importantly, a subset of serotonin neurons developed large aggregates positive to human SOD1 in end-stage G37R mice, but such aggregates were not observed in end-stage G37R^{ΔTph2} serotonin neurons, although they were readily detectable in neighboring cells. Thus, our data are consistent with a selective rescue of mutant SOD1 expression in adult serotonergic neurons of G37R^{ΔTph2} mice.

Atrophy and Neurochemical Alterations of Serotonin Neurons Are Cell Autonomous in SOD1(G37R) Mice

We first asked whether rescue of mutant SOD1 expression in serotonergic neurons was sufficient to rescue serotonin neurons themselves. To this aim, we performed TPH2 immunohistochemistry in end-stage G37R^{ΔTph2} mice and littermate G37R mice (Fig 2). Consistent with previous results,¹⁶ we observed that individual serotonin neurons displayed lower TPH2 immunoreactivity in the dorsal raphe and median raphe nuclei of G37R mice as well as in the spinal cord projecting nucleus raphe obscurus. This loss of immunoreactivity was entirely reverted in G37R^{ΔTph2} mice (see Fig 2A–C) and was consistently observed using immunofluorescence (see Fig 1C). Furthermore, TPH2 immunoreactivity was largely absent in the hypothalamus of G37R mice, similar to what was previously observed in *SOD1*(G86R) mice,²⁰ and mostly preserved in G37R^{ΔTph2} mice (see Fig 2D). To determine whether rescue of mutant SOD1 expression was able to restore serotonergic innervation on motor neurons, we performed serotonin immunohistochemistry on spinal cord sections. Degeneration of serotonin neurons is usually associated with the appearance of dystrophic serotonin fibers that are enlarged, swollen, and clustered specifically in distal projection regions.^{27–30} In Wt mice, serotonin innervation of the lumbar spinal cord presented as thin varicose fibers closely apposed to motor neurons, as previously observed.³¹ Contrastingly with this, dystrophic serotonin axons, with enlarged varicosities and bulbous structures, were frequently observed in the lumbar spinal cord of G37R mice, at a distance from motor neurons. These abnormal structures were much less frequent in G37R^{ΔTph2} mice, and spinal cord serotonin

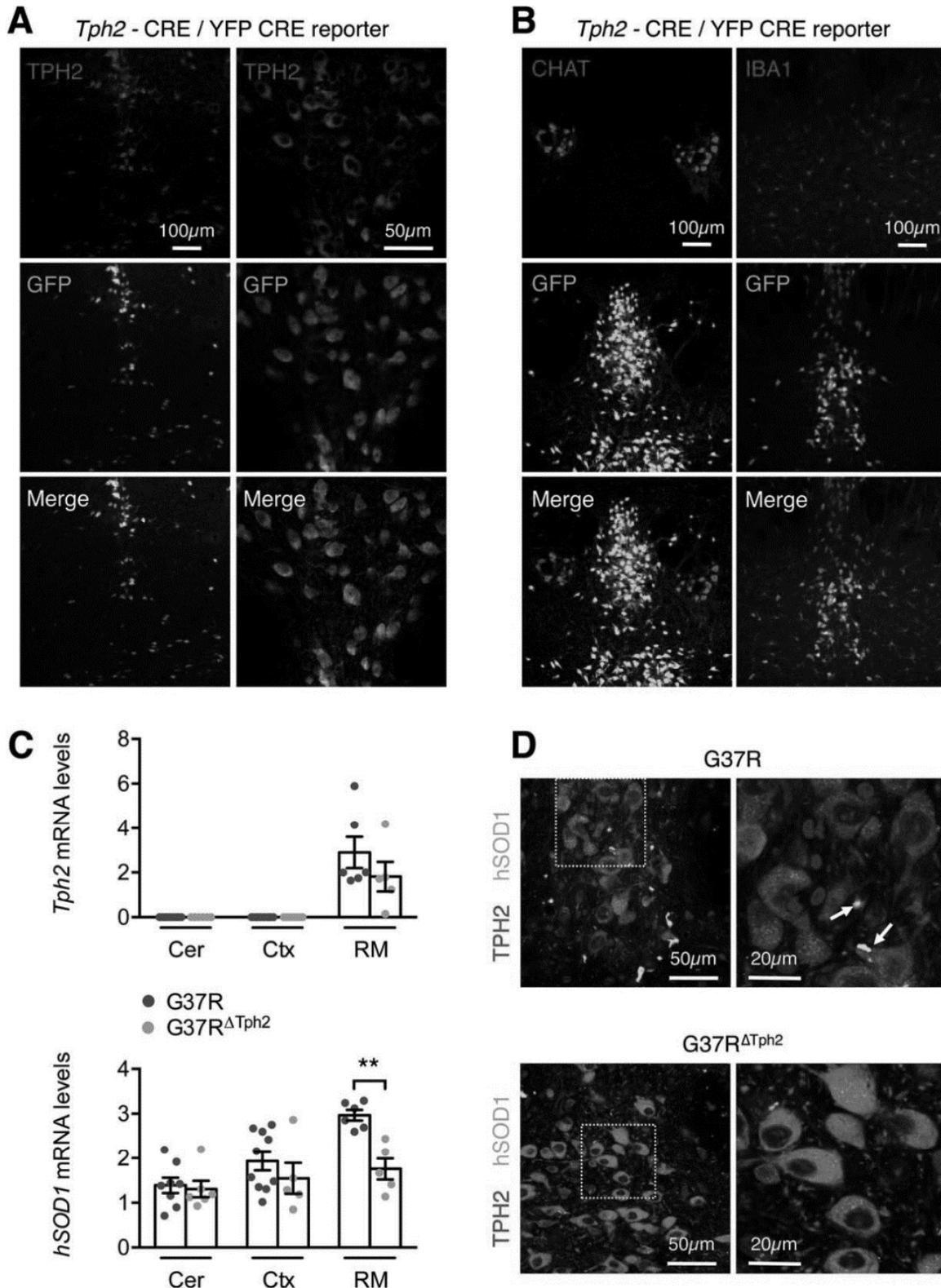


FIGURE 1: Efficient recombination in adult serotonergic neurons. (A, B) Representative confocal images of dorsal raphe serotonergic neurons labeled with green fluorescent protein (GFP) antibody (Cre reporter, green) and either TPH2 antibody (A, red), choline acetyl transferase (CHAT) antibody (cholinergic neurons, B, left column, red) or IBA1 (microglia, B, right column, red) in mice doubly transgenic for *Tph2*-Cre and YFP Cre reporter alleles. $n = 5$ mice, all treated with tamoxifen at 56 days of age and sacrificed 1 month after gavage. We observed a complete overlap between TPH2 and GFP immunoreactivities; CHAT- and IBA1-positive cells were all GFP-negative. (C) mRNA levels of *Tph2* (upper panel) and human SOD1 (*hSOD1*, lower panel) in microdissected cerebellum (Cer), cortex (Ctx), and raphe magnus (RM) of G37R ($n = 6$) and G37R Δ Tph2 ($n = 5$) mice 1 month after recombination induction. $**p < 0.01$ by Mann-Whitney test. Note that *Tph2* mRNA is only detected in raphe magnus, and *hSOD1* expression is selectively decreased in the raphe magnus of G37R Δ Tph2 mice. (D) Representative confocal image of TPH2 (red) and human SOD1 (green) immunoreactivities in G37R and G37R Δ Tph2 end-stage mice. $n = 5$ for all genotypes. Note the presence of bright hSOD1-positive aggregates (arrows) in G37R serotonergic neurons, but not in G37R Δ Tph2 serotonergic nuclei.

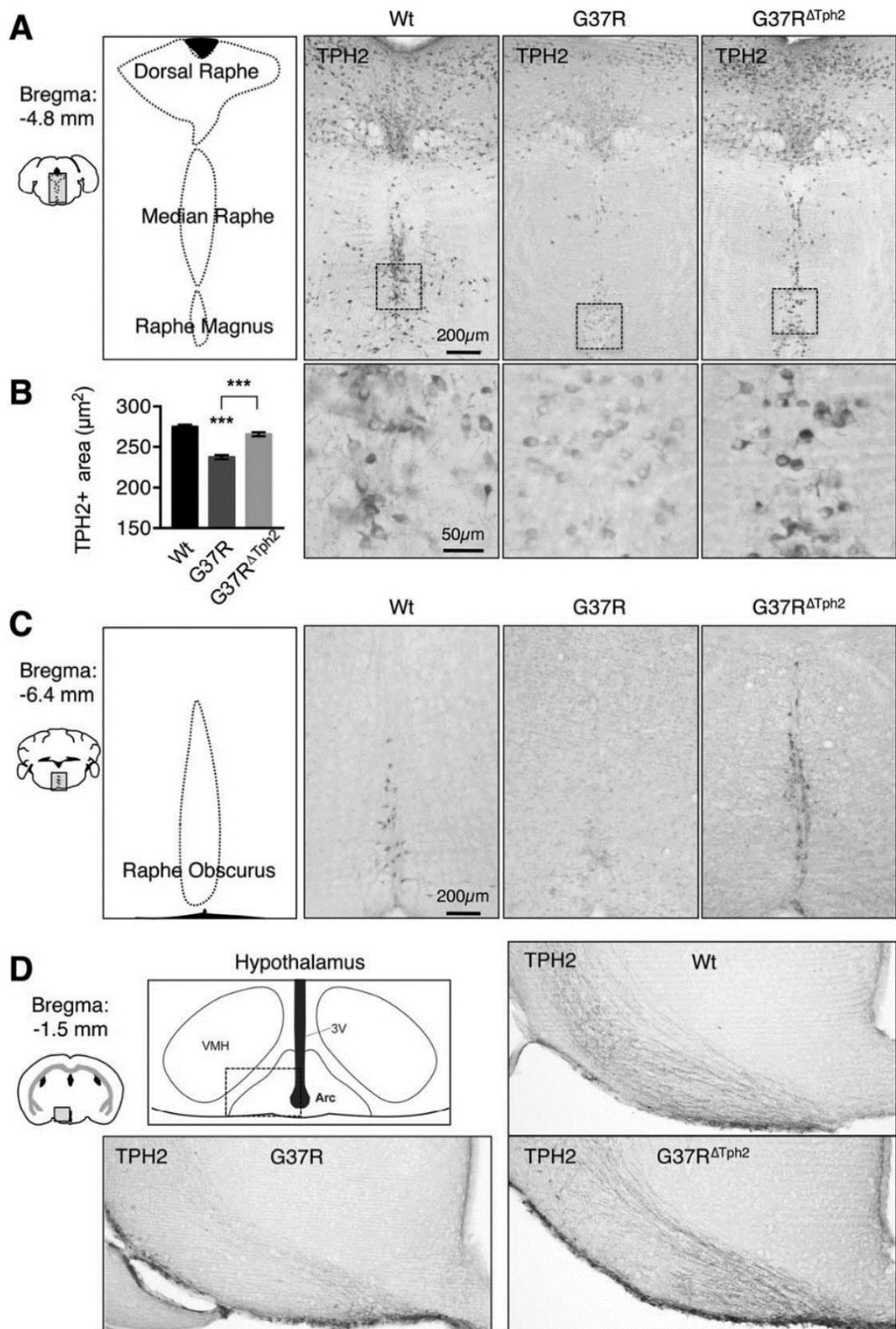


FIGURE 2: Disease-related alterations in serotonergic neurons are cell autonomous in *SOD1*(G37R) mice. (A) Representative TPH2 immunoreactivity in the brainstem (dorsal and median raphe) of wild-type (Wt), G37R, and G37R^{ΔTph2} end-stage mice. *n* = 5 for all genotypes. Note that TPH2 immunoreactivity is weaker in G37R serotonergic neurons than in G37R^{ΔTph2} serotonergic neurons. The location of the section relative to the bregma is indicated on the left. (B) Mean area of TPH2-positive neurons in Wt (black columns), G37R (dark gray columns), and G37R^{ΔTph2} (light gray columns) end-stage mice. ****p* < 0.001 versus Wt, Kruskal–Wallis. *n* = 5 mice for all genotypes, *n* = 4 brainstem sections/animal. (C) Representative TPH2 immunoreactivity in the brainstem (raphe obscurus) of Wt, G37R, and G37R^{ΔTph2} end-stage mice. *n* = 5 for all genotypes. The location of the section relative to the bregma is indicated on the left. (D) Representative TPH2 immunoreactivity in the hypothalamus of Wt, G37R, and G37R^{ΔTph2} end-stage mice. TPH2-immunopositive axons are strongly labeled in the hypothalamus of Wt and G37R^{ΔTph2} mice, but faintly stained in G37R mice. The location of the section relative to the bregma is indicated on the left. VMH, ventromedial hypothalamus; 3V, 3rd ventricle; Arc, Arcuate nucleus.

immunoreactivity resembled that of Wt mice (Fig 3A). Double serotonin/CHAT immunofluorescence further confirmed that most motor neurons of G37R mice were devoid of closely apposed serotonin varicosities, whereas this was not the case for G37R^{ΔTPH2} motor neurons (see Fig 3B). In Wt mice, 24 of 25 studied motor neurons displayed serotonin buttons in the vicinity of their plasma membrane. Contrastingly, 28 of 52 motor

neurons of G37R mice were completely deprived of serotonin innervation, as were only 7 of 45 motor neurons of G37R^{ΔTPH2} mice ($p < 0.005$ between G37R and G37R^{ΔTPH2} mice, Fisher exact test). Thus, rescuing mutant SOD1 expression in serotonergic neurons restores their TPH2 immunopositivity, and largely rescues their distal abnormalities in the ventral horn of the spinal cord.

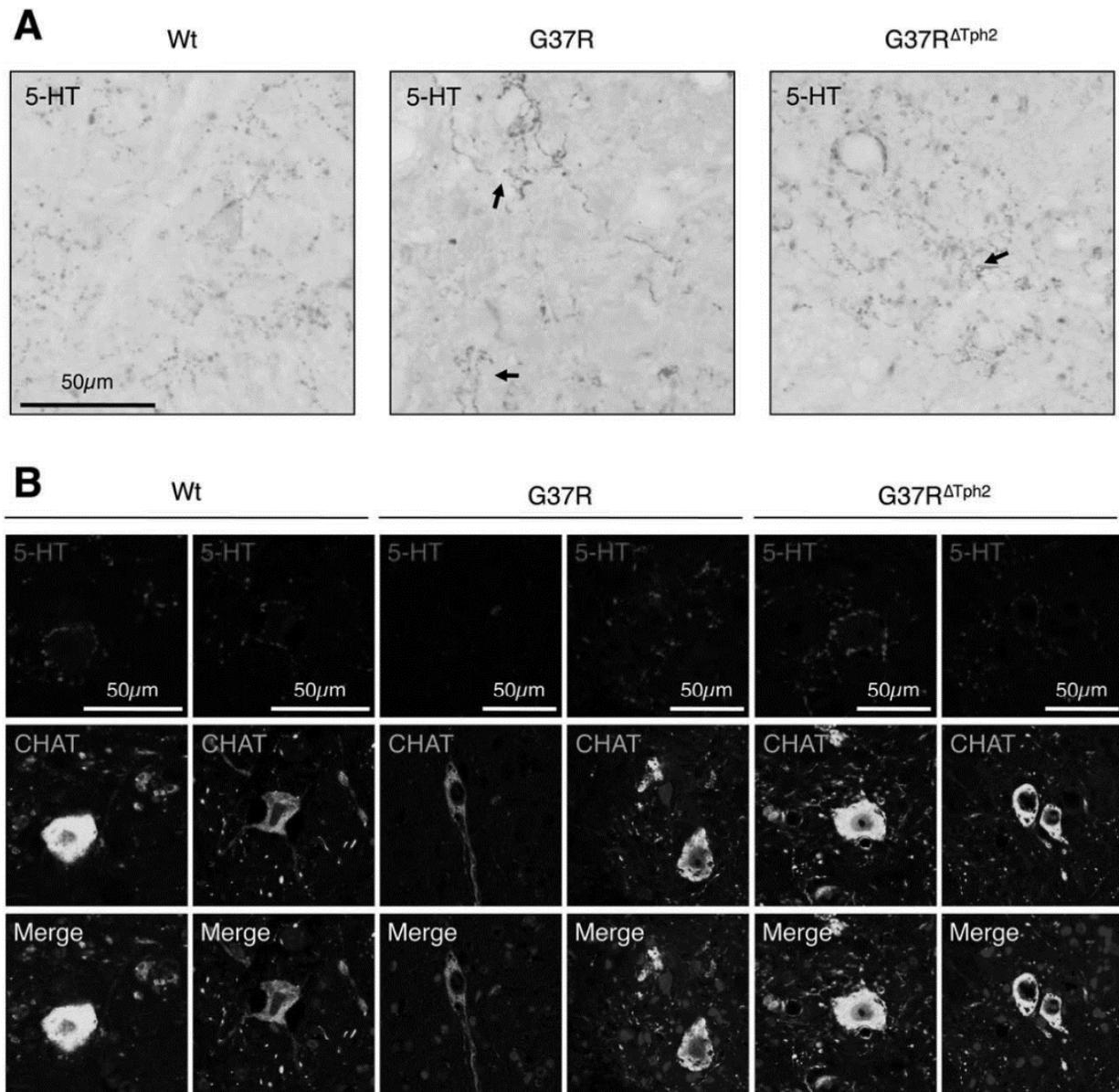


FIGURE 3: Rescuing serotonin neurons ameliorates the degeneration of serotonin terminals in the ventral horn of the spinal cord. (A) Representative 5-HT immunohistochemistry images in ventral horn of the spinal cord of wild-type (Wt; left), G37R (middle), and G37R^{ΔTPH2} (right) mice. Serotonin immunoreactivity is punctate in Wt mice. In G37R mice, punctate serotonin buttons are rare, and large axonal swellings are observed (arrows). In G37R^{ΔTPH2} mice, punctate immunoreactivity is largely restored, whereas rare axonal swellings could still be observed (arrows). $n = 5$ for all genotypes. (B) Representative confocal images of 5-HT (red) and choline acetyl transferase (CHAT; green) immunoreactivities in the ventral horn of G37R and G37R^{ΔTPH2} end-stage mice. Blue color in the merged images indicates nuclei as stained with Hoechst 33342. Note that serotonin-positive buttons decorate the cell body of CHAT-positive motor neurons in Wt and G37R^{ΔTPH2} mice. Contrastingly, G37R motor neurons are mostly not innervated by serotonin-positive buttons. $n = 5$ for all genotypes.

Rescuing Serotonin Neurons Eliminates Spasticity

Spasticity is a major symptom of ALS, and previous evidence suggested that spasticity associated with ALS was caused by constitutive activity of 5-HT_{2B}/5-HT_{2C} receptors.¹⁶ In mice, the development of spasticity is visually observed by spastic contractions of tail muscles at end stage. Tail spasticity was prominently observed in 10 of 13 G37R mice at end stage, whereas, contrastingly, only 1 of 11 G37R^{ΔTph2} mice showed this phenotype ($p = 0.0013$, Fisher exact test; Fig 4A). To further quantify this effect, we measured LLR using EMG in awake mice at end stage. This quantitative method is correlated with spasticity after spinal cord injury, and allows measuring the biological effects of classical antispastic drugs.^{10,32} We previously showed that 5-HT_{2B}/5-HT_{2C} inverse agonists, such as SB206553 (later referred as SB206), are able to completely block existing LLRs, suggesting their antispastic potential.¹⁶ We observed that whereas robust LLRs are observed in end-stage G37R mice and blocked by SB206 application, such LLRs did not develop in G37R^{ΔTph2} mice (see Fig 4B–D for quantification). Thus, the expression of mutant SOD1 in serotonin neurons is necessary to trigger spasticity.

Rescuing Serotonin Neurons Hastens Onset of Paralysis and Worsens Motor Neuron Atrophy

Spasticity is thought to represent a compensatory mechanism activated by motor neurons, enabling them to maintain their function despite loss of excitatory input.⁹ Consistent with this, the absence of spasticity in G37R^{ΔTph2} mice was associated with worsened grip strength and with earlier onset of paralysis (Fig 5). G37R^{ΔTph2} mice displayed earlier age at onset of motor symptoms, but reached end stage at similar ages as G37R mice, leading to increased disease duration. G37R^{ΔTph2} mice displayed similar loss in motor neurons at end stage, but motor neuron atrophy was much more pronounced (Fig 6). Importantly, astrocytosis, as revealed using GFAP immunohistochemistry or *Gfap* mRNA levels, appeared similar in the spinal cord of G37R and G37R^{ΔTph2} mice. Similarly, microglia appeared normally activated in the spinal cord of G37R^{ΔTph2} mice as assessed using either IBA1 immunohistochemistry or *Iba1* mRNA levels. Altogether, this suggests that rescuing spasticity had strong deleterious effects on motor neurons, while not affecting surrounding glial cells. In all, rescuing serotonin neurons triggers an earlier disease onset and worsens motor neuron function.

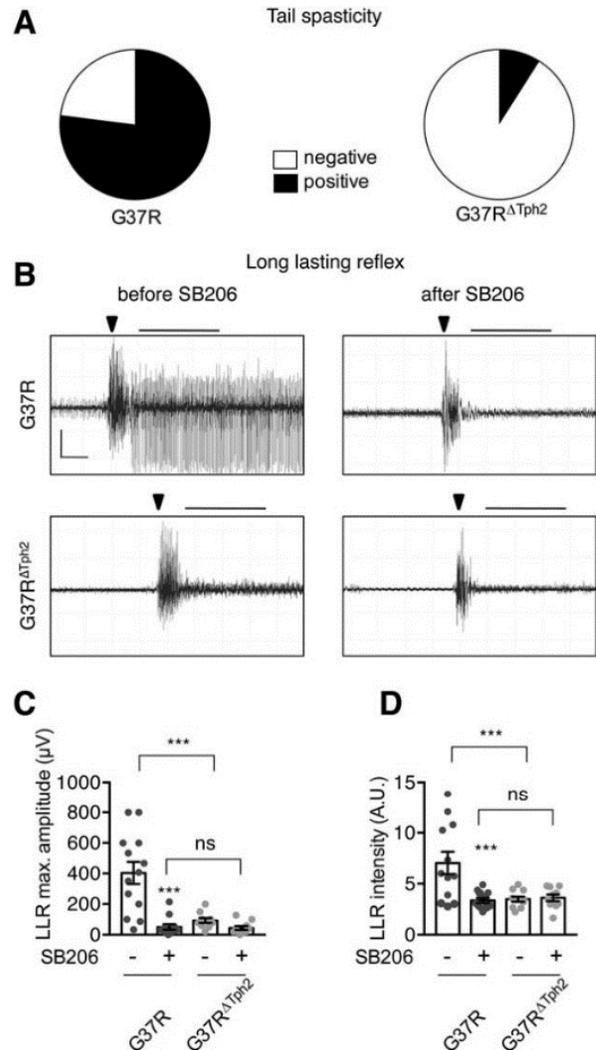


FIGURE 4: Rescuing serotonin neurons eliminates spasticity. (A) Frequency of tail spasticity in G37R and G37R^{ΔTph2} end-stage mice as recorded from visual inspection. (B) Representative recordings of long-lasting reflex (LLR) using tail electromyography (EMG) in G37R and G37R^{ΔTph2} end-stage mice. Recordings were made before and 5 minutes after SB206553 injection. (C, D) Quantitative analysis of maximal LLR amplitude (C) and mean LLR signal intensity (D) in tail EMG per animal before and 5 minutes after injection, in G37R (dark gray scatter plots, $n = 13$) and G37R^{ΔTph2} (light gray scatter plots, $n = 12$) end-stage mice. *** $p < 0.001$ versus wild type by Kruskal–Wallis test. A.U. = arbitrary units; ns = not significant.

Discussion

Our current study demonstrates that the degeneration of brainstem serotonin neurons is responsible for the development of hyper-reflexia, and thus of spasticity, in ALS mice. This hyper-reflexia is able to compensate for motor deficits, allowing the maintenance of motor function after disease onset. These findings have important consequences for our understanding of ALS pathophysiology

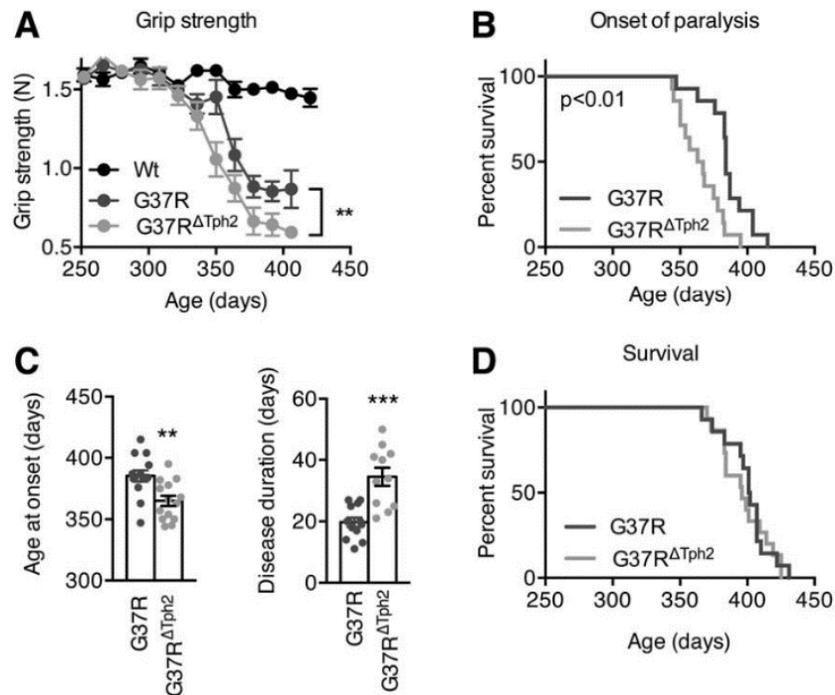


FIGURE 5: Rescuing serotonin neurons hastens onset of paralysis. (A) Muscle grip strength curves in wild-type (Wt), G37R, and G37R^{ΔTPH2} mice. $n = 10\text{--}15$ mice per genotype. $**p < 0.005$ for genotypes between G37R and G37R^{ΔTPH2} mice by repeated 2-way analysis of variance. (B–D) Kaplan–Meier plot of onset of paralysis (B) and survival (D) in G37R (in dark gray, $n = 14$) and G37R^{ΔTPH2} mice (in light gray, $n = 15$). Representative histograms of age at disease onset (from birth to peak weight) and disease duration (from peak weight to death) in G37R (dark gray scatter plots) and G37R^{ΔTPH2} mice (light gray scatter plots) are shown in C. $**p < 0.001$, $***p < 0.0001$ by Mann–Whitney test. Log-rank test (Mantel–Cox) for onset of paralysis: $p = 0.0014$; log-rank test (Mantel–Cox) for survival: $p = 0.7$.

and management, as well as for all diseases involving spasticity.

A first major finding of the current study is that alterations of serotonin neurons during ALS disease are cell autonomous. This is demonstrated by the rescue of alterations in serotonin neurons observed upon deletion of the mutant SOD1 transgene in adult serotonergic neurons. To this aim, we used a conditional Cre transgene that allowed the rescue in adult mice, thereby avoiding potentially confounding developmental effects. Multiple indexes of serotonin neuron degeneration were rescued in G37R^{ΔTPH2} mice, including decreased TPH2 immunoreactivity, decreased size of cell bodies, and occurrence of degenerating serotonergic fibers. This cell autonomous nature of serotonin neuron degeneration contrasts with the situation observed in motor neurons, in which the local environment appears critical.^{17,33,34} Such a difference could be due to intrinsic properties of serotonergic neurons. We observed very few SOD1-positive aggregates in TPH2 neurons, contrasting with other cell types that accumulated large amounts of aggregated SOD1. This is consistent with our previous observation of a lack of TDP-43 aggregates in serotonergic

neurons of ALS patients¹⁶ and suggests that serotonin neurons display mechanisms of clearance of aggregate prone proteins distinct from other neuronal types. However, few axonal swellings remained visible in the spinal cord of G37R^{ΔTPH2} mice, suggesting that the serotonin neurons, although mostly preserved, could suffer from the local inflammatory milieu of the spinal cord at end stage. Our demonstration of the cell autonomous nature of serotonergic neuron degeneration in ALS opens the way for studying mechanisms of degeneration in cultured serotonergic neurons, in particular in transdifferentiated serotonergic neurons of ALS patients, using protocols recently published.^{35,36}

The selective rescue of serotonin neurons in G37R^{ΔTPH2} mice allowed us to identify the primary consequences of this degeneration. Interestingly, and despite the important roles of serotonin neurons in multiple brain functions, many phenotypes developed by G37R mice were not affected. For instance, the rescue of serotonin neurons did not modify the extent of motor neuron degeneration, astrocytosis, or microgliosis. As a consequence, survival of G37R^{ΔTPH2} mice was not significantly different from G37R mice. It is important to mention

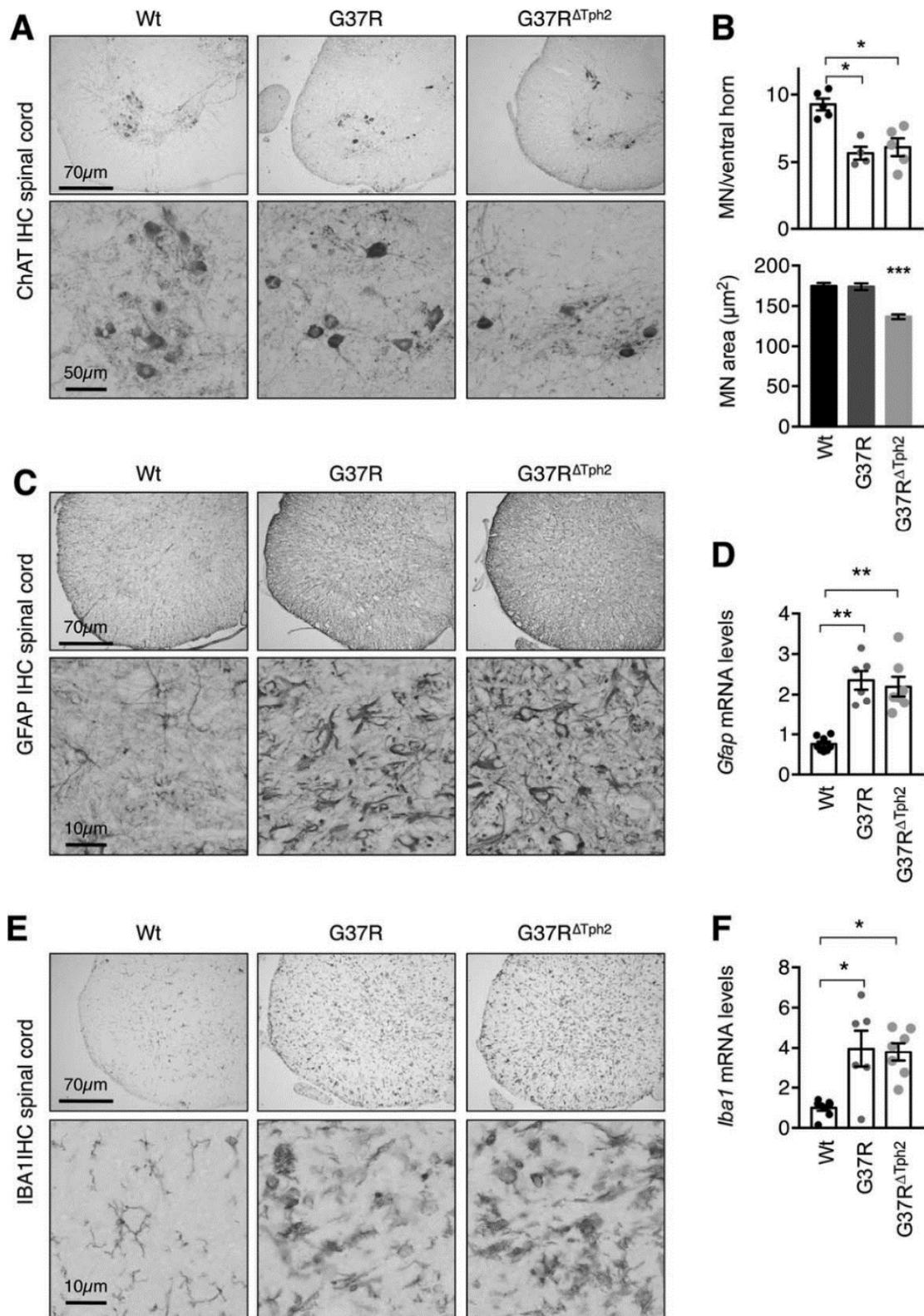


FIGURE 6: Rescuing serotonin neurons worsens motor neuron atrophy and does not modify gliosis. (A) Representative choline acetyl transferase (ChAT) immunohistochemical (IHC) images in wild-type (Wt), G37R, and G37R Δ Tph2 mice. Two magnifications are shown. $n = 5$ for all genotypes. (B) Motor neuron (MN) mean numbers and area in Wt (black), G37R (dark gray), and G37R Δ Tph2 (light gray) mice. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ versus Wt by Kruskal–Wallis test. $n = 5$, 2 sections per animal for all genotypes. (C, E) Representative glial fibrillary acidic protein (GFAP; C) and IBA1 (E) IHC images in Wt, G37R, and G37R Δ Tph2 mice. Two magnifications are shown. $n = 5$ for all genotypes. Expression of human SOD1 leads to strong astrocytosis and microgliosis independently of the presence of a *Tph2*-Cre allele. (D, F) mRNA levels of *Gfap* (D) and *Iba1* (F) in spinal cord of end-stage G37R ($n = 6$) and G37R Δ Tph2 ($n = 7$) mice. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ versus Wt by Kruskal–Wallis test. Expression of human SOD1 leads to upregulation of *Gfap* and *Iba1* mRNAs independently of the presence of a *Tph2*-Cre allele.

that we performed the rescue of serotonin neurons in adults, and alterations in motor neuron excitability and locomotor rhythms, presumably serotonin-dependent, were documented in embryonic or perinatal mice in other mutant SOD1 mice.^{37,38} Thus, we cannot completely exclude that early embryonic alterations in serotonin neurons contribute to other aspects of ALS pathogenesis. Last, mutant SOD1 mice, like SOD1-ALS patients, do not exhibit frontal symptoms that are commonly associated with other forms of ALS. Thus, our current study cannot determine whether degeneration of serotonin neurons could cause frontal symptoms in ALS. Serotonin neurons are deeply involved in the regulation of mood, social behavior, and executive functions,^{39–41} which could all potentially be impaired during frontal symptoms of ALS. Thus, further studies are required to unravel the role of serotonin neurons in frontal lobe-related symptoms.

The major consequence of the rescue of serotonin neurons in G37R^{ΔTph2} mice was a complete absence of spasticity. This was obvious from visual inspection of tail spasticity and quantified using electrophysiological characterization of LLRs in the tail muscles, a well-documented measure of spasticity in rodents.^{9,22} We observed that G37R^{ΔTph2} mice developed earlier paralysis onset, associated with decreased muscle strength. This suggests that the lack of spasticity in these mice does not allow compensatory rescue of motor function. Importantly, the predominance of UMN signs, including spasticity, in ALS patients is strongly associated with better prognosis.^{13,42,43} The lack of spasticity in G37R^{ΔTph2} mice was associated with an absence of the constitutive activity of the 5-HT_{2B/2C} receptors, as these mice were completely insensitive to a 5-HT_{2B/2C} inverse agonist able to abolish muscle spasms.¹⁶ This supports a model in which degeneration of serotonin neurons leads to constitutive activity of 5-HT_{2B/2C} receptors, leading to motor neuron hyperexcitability, spasticity, and subsequent compensation of motor defects. 5-HT_{2B/2C} inverse agonists completely rescue spasticity and worsen motor function in SCI models.^{9,12}

Our results significantly alter the current paradigm of ALS pathophysiology. Spasticity in ALS is thought to be caused by the degeneration of UMNs of the motor cortex that fine-tune motor activity. Consistently, spasticity is considered as a cardinal symptom of the so-called UMN syndrome, central to the diagnosis of ALS.^{13,14} Our current data establish that this direct connection between UMN loss and spasticity is wrong, and that degeneration of serotonin neurons is essential in triggering spasticity in ALS. It is important to note that our data do not formally establish that the degeneration of brainstem serotonin neurons innervating motor neurons

is required for spasticity. *Tph2* is also expressed in rare neurons outside raphe nuclei.^{44,45} Moreover, serotonergic neurons densely innervate the motor cortex,⁴⁶ and serotonin modulates cortical movement representation through the 5-HT_{1A} receptor.⁴⁷ The 5-HT_{3A} receptor is also expressed by a large subset of inhibitory cortical neurons, and modulates motor integration.⁴⁸ Thus, it remains possible that degeneration of serotonin neurons triggers spasticity through indirect effects on motor cortex. However, we consider it unlikely, because serotonergic mechanisms of spasticity appear very similar between ALS mice and spinal cord injury models in which serotonergic projections to the cortex are likely preserved. Importantly, although we show here that degeneration of serotonin neurons is necessary to trigger spasticity, we do not rule out that UMN loss or dysfunction is also necessary. It should also be noted that the corticospinal tracts of rodents and humans differ in multiple ways, including in robustness and spinal organization. Further studies are thus required to strengthen the translational relevance of our experimental findings.

To summarize, our current study demonstrates that the classical view of spasticity arising solely from UMN loss in ALS is, at best, incomplete. The demonstration that the degeneration of serotonin neurons is necessary to elicit spasticity suggests that antispastic strategies should focus on the serotonergic drugs widely available to improve the treatment of this painful symptom. Besides ALS, multiple neurological diseases are associated with spasticity, and our current results might thus be of critical importance for treating spasticity in diseases as diverse as spinal cord injury and hereditary spastic paraplegia.

Acknowledgment

This work was supported by the fondation recherche sur le cerveau (2015, L.D.) the Fondation Thierry Latran (SpastALS, L.D.), the “association pour la recherche sur la sclérose latérale amyotrophique” (2014, L.D.), and the European Research Council under the European Union’s Seventh Framework Program (FP7/20072013, ERC Grant Agreement CorticALS, C.R.).

Author Contributions

L.D., C.R., and H.E.O. contributed to study concept and design; all authors contributed to data acquisition and analysis; H.E.O. and L.D. drafted the manuscript and figures.

Potential Conflicts of Interest

Nothing to report.

References

- Lance JW. Symposium synopsis. In: Feldman RG, Young RR, Koella WP, eds. Spasticity: disordered motor control. Chicago: Year Book Medical Publisher, 1980:485–494.
- Nielsen JB, Crone C, Hultborn H. The spinal pathophysiology of spasticity—from a basic science point of view. *Acta Physiol* 2007; 189:171–180.
- D'Amico JM, Condliffe EG, Martins KJ, et al. Recovery of neuronal and network excitability after spinal cord injury and implications for spasticity. *Front Integr Neurosci* 2014;8:36.
- Dietz V, Sinkjaer T. Spastic movement disorder: impaired reflex function and altered muscle mechanics. *Lancet Neurol* 2007;6:725–733.
- Gorassini MA, Knash ME, Harvey PJ, et al. Role of motoneurons in the generation of muscle spasms after spinal cord injury. *Brain* 2004;127(pt 10):2247–2258.
- Norton JA, Bennett DJ, Knash ME, et al. Changes in sensory-evoked synaptic activation of motoneurons after spinal cord injury in man. *Brain* 2008;131(pt 6):1478–1491.
- Brocard C, Plantier V, Boulenguez P, et al. Cleavage of Na channels by calpain increases persistent Na current and promotes spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 2016;22:404–411.
- Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, et al. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 2010;16:302–307.
- Murray KC, Nakae A, Stephens MJ, et al. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT_{2C} receptors. *Nat Med* 2010;16:694–700.
- Rank MM, Murray KC, Stephens MJ, et al. Adrenergic receptors modulate motoneuron excitability, sensory synaptic transmission and muscle spasms after chronic spinal cord injury. *J Neurophysiol* 2011;105:410–422.
- Murray KC, Stephens MJ, Ballou EW, et al. Motoneuron excitability and muscle spasms are regulated by 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor activity. *J Neurophysiol* 2011;105:731–748.
- Fouad K, Rank MM, Vavrek R, et al. Locomotion after spinal cord injury depends on constitutive activity in serotonin receptors. *J Neurophysiol* 2010;104:2975–2984.
- Swinen B, Robberecht W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2014;10:661–670.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2011;377:942–955.
- Lemon RN. Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci* 2008;31:195–218.
- Dentel C, Palamiuc L, Henriques A, et al. Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* 2013;136(pt 2):483–493.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006;312:1389–1392.
- Harrison M, O'Brien A, Adams L, et al. Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. *Neuroimage* 2013;68:22–29.
- d'Errico P, Boido M, Piras A, et al. Selective vulnerability of spinal and cortical motor neuron subpopulations in delta7 SMA mice. *PLoS One* 2013;8:e82654.
- Vercruyse P, Sinniger J, El Oussini H, et al. Alterations in the hypothalamic melanocortin pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2016;139(pt 4):1106–1122.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
- Bennett DJ, Sanelli L, Cooke CL, et al. Spastic long-lasting reflexes in the awake rat after sacral spinal cord injury. *J Neurophysiol* 2004; 91:2247–2258.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, et al. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2008;11:251–253.
- Zhong Z, Deane R, Ali Z, et al. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci* 2008;11:420–422.
- Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, et al. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:4465–4470.
- Kang SH, Li Y, Fukaya M, et al. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2013;16:571–579.
- O'Hearn E, Battaglia G, De Souza EB, et al. Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J Neurosci* 1988;8:2788–2803.
- Azmitia EC, Nixon R. Dystrophic serotonergic axons in neurodegenerative diseases. *Brain Res* 2008;1217:185–194.
- van Luijtelaa MG, Steinbusch HW, Tonnaer JA. Similarities between aberrant serotonergic fibers in the aged and 5,7-DHT denervated young adult rat brain. *Exp Brain Res* 1989;78:81–89.
- Jin Y, Dougherty SE, Wood K, et al. Regrowth of serotonin axons in the adult mouse brain following injury. *Neuron* 2016;91:748–762.
- Ridet JL, Geffard M, Privat A. Light and electron microscopic studies of the effects of p-chloroamphetamine on the monoaminergic innervation of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1994;343:281–296.
- Li Y, Li X, Harvey PJ, et al. Effects of baclofen on spinal reflexes and persistent inward currents in motoneurons of chronic spinal rats with spasticity. *J Neurophysiol* 2004;92:2694–2703.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003;302:113–117.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 2006; 52:39–59.
- Xu Z, Jiang H, Zhong P, et al. Direct conversion of human fibroblasts to induced serotonergic neurons. *Mol Psychiatry* 2016;21: 62–70.
- Vadodaria KC, Mertens J, Paquola A, et al. Generation of functional human serotonergic neurons from fibroblasts. *Mol Psychiatry* 2016;21:49–61.
- Martin E, Cazenave W, Cattaert D, et al. Embryonic alteration of motoneuronal morphology induces hyperexcitability in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2013;54: 116–126.
- Amendola J, Verrier B, Roubertoux P, et al. Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 2004;20:2822–2826.
- Puig MV, Gener T. Serotonin modulation of prefronto-hippocampal rhythms in health and disease. *ACS Chem Neurosci* 2015;6:1017–1025.
- Challis C, Berton O. Top-down control of serotonin systems by the prefrontal cortex: a path toward restored socioemotional function in depression. *ACS Chem Neurosci* 2015;6:1040–1054.
- Puglisi-Allegra S, Andolina D. Serotonin and stress coping. *Behav Brain Res* 2015;277:58–67.

42. Chio A, Calvo A, Moglia C, et al. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82:740–746.
43. Gordon PH, Cheng B, Katz IB, et al. Clinical features that distinguish PLS, upper motor neuron-dominant ALS, and typical ALS. *Neurology* 2009;72:1948–1952.
44. Carkaci-Salli N, Salli U, Kuntz-Melcavage KL, et al. TPH2 in the ventral tegmental area of the male rat brain. *Brain Res Bull* 2011; 84:376–380.
45. Chen GL, Miller GM. Advances in tryptophan hydroxylase-2 gene expression regulation: new insights into serotonin-stress interaction and clinical implications. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012;159B:152–171.
46. Moore RY, Halaris AE, Jones BE. Serotonin neurons of the mid-brain raphe: ascending projections. *J Comp Neurol* 1978;180: 417–438.
47. Scullion K, Boychuk JA, Yamakawa GR, et al. Serotonin 1A receptors alter expression of movement representations. *J Neurosci* 2013;33:4988–4999.
48. Lee S, Kruglikov I, Huang ZJ, et al. A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 2013;16:1662–1670.

Bibliographie

Bibliographie

- Agosta F, Pagani E, Petrolini M, Sormani MP, Caputo D, et al. 2010. MRI predictors of long-term evolution in amyotrophic lateral sclerosis. *The European journal of neuroscience* 32: 1490-6
- Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, et al. 1999. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Human molecular genetics* 8: 157-64
- Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, et al. 2014. Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* 81: 536-43
- Almer G, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, et al. 2001. Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 49: 176-85
- Almer G, Teismann P, Stevic Z, Halaschek-Wiener J, Deecke L, et al. 2002. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology* 58: 1277-9
- Altanbyek V, Cha SJ, Kang GU, Im DS, Lee S, et al. 2016. Imbalance of mitochondrial dynamics in Drosophila models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and biophysical research communications* 481: 259-64
- Altiok N, Altiok S, Changeux JP. 1997. Heregulin-stimulated acetylcholine receptor gene expression in muscle: requirement for MAP kinase and evidence for a parallel inhibitory pathway independent of electrical activity. *The EMBO journal* 16: 717-25
- Aman P, Panagopoulos I, Lassen C, Fioretos T, Mencinger M, et al. 1996. Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics* 37: 1-8
- An W, Kim J, Roeder RG. 2004. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* 117: 735-48
- Anderson CM, Hu J, Barnes RM, Heidt AB, Cornelissen I, Black BL. 2015. Myocyte enhancer factor 2C function in skeletal muscle is required for normal growth and glucose metabolism in mice. *Skeletal muscle* 5: 7
- Andersson MK, Stahlberg A, Arvidsson Y, Olofsson A, Semb H, et al. 2008. The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC cell biology* 9: 37
- Anseau E, Eidahl JO, Lancelot C, Tassin A, Matteotti C, et al. 2016. Homologous Transcription Factors DUX4 and DUX4c Associate with Cytoplasmic Proteins during Muscle Differentiation. *PLoS one* 11: e0146893
- Antri M, Orsal D, Barthe JY. 2002. Locomotor recovery in the chronic spinal rat: effects of long-term treatment with a 5-HT2 agonist. *The European journal of neuroscience* 16: 467-76
- Armstrong GA, Drapeau P. 2013. Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS. *Human molecular genetics* 22: 4282-92
- Arnold AS, Gill J, Christe M, Ruiz R, McGuirk S, et al. 2014. Morphological and functional remodelling of the neuromuscular junction by skeletal muscle PGC-1alpha. *Nature communications* 5: 3569

- Arnold ES, Ling SC, Huelga SC, Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, et al. 2013. ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: E736-45
- Ash PE, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin WL, et al. 2013. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77: 639-46
- Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu YF, Petrucelli L, et al. 2008. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *Journal of cell science* 121: 3778-85
- Ayers JI, Fromholt SE, O'Neal VM, Diamond JH, Borchelt DR. 2016. Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta neuropathologica* 131: 103-14
- Baechtold H, Kuroda M, Sok J, Ron D, Lopez BS, Akhmedov AT. 1999. Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. *The Journal of biological chemistry* 274: 34337-42
- Bailey CD, Alves NC, Nashmi R, De Biasi M, Lambe EK. 2012. Nicotinic alpha5 subunits drive developmental changes in the activation and morphology of prefrontal cortex layer VI neurons. *Biological psychiatry* 71: 120-8
- Bailey CD, De Biasi M, Fletcher PJ, Lambe EK. 2010. The nicotinic acetylcholine receptor alpha5 subunit plays a key role in attention circuitry and accuracy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 9241-52
- Baldwin KR, Godena VK, Hewitt VL, Whitworth AJ. 2016. Axonal transport defects are a common phenotype in Drosophila models of ALS. *Human molecular genetics* 25: 2378-92
- Banerjee A, Vest KE, Pavlath GK, Corbett AH. 2017. Nuclear poly(A) binding protein 1 (PABPN1) and Matrin3 interact in muscle cells and regulate RNA processing. *Nucleic acids research* 45: 10706-25
- Bansal M, Moharir SC, Sailasree SP, Sirohi K, Sudhakar C, et al. 2018. Optineurin promotes autophagosome formation by recruiting the autophagy-related Atg12-5-16L1 complex to phagophores containing the Wipi2 protein. *The Journal of biological chemistry* 293: 132-47
- Barik A, Zhang B, Sohal GS, Xiong WC, Mei L. 2014. Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction. *Developmental neurobiology* 74: 828-38
- Bartoli M, Ramarao MK, Cohen JB. 2001. Interactions of the rapsyn RING-H2 domain with dystroglycan. *The Journal of biological chemistry* 276: 24911-7
- Barzago C, Lum J, Cavalcante P, Srinivasan KG, Faggiani E, et al. 2016. A novel infection- and inflammation-associated molecular signature in peripheral blood of myasthenia gravis patients. *Immunobiology* 221: 1227-36
- Basso M, Pozzi S, Tortarolo M, Fiordaliso F, Bisighini C, et al. 2013. Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry* 288: 15699-711

- Batut J, Duboe C, Vandell L. 2011. The methyltransferases PRMT4/CARM1 and PRMT5 control differentially myogenesis in zebrafish. *PLoS one* 6: e25427
- Baumer D, Hilton D, Paine SM, Turner MR, Lowe J, et al. 2010. Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations. *Neurology* 75: 611-8
- Bayer H, Lang K, Buck E, Higelin J, Barteczko L, et al. 2017. ALS-causing mutations differentially affect PGC-1alpha expression and function in the brain vs. peripheral tissues. *Neurobiology of disease* 97: 36-45
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. 1993. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364: 584
- Bendotti C, Calvaresi N, Chiveri L, Prella A, Moggio M, et al. 2001. Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *Journal of the neurological sciences* 191: 25-33
- Bengoechea R, Pittman SK, Tuck EP, True HL, Weihl CC. 2015. Myofibrillar disruption and RNA-binding protein aggregation in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 1D. *Human molecular genetics* 24: 6588-602
- Bensimon G, Lacomblez L, Delumeau JC, Bejuit R, Truffinet P, et al. 2002. A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology* 249: 609-15
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England journal of medicine* 330: 585-91
- Bentmann E, Neumann M, Tahirovic S, Rodde R, Dormann D, Haass C. 2012. Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *The Journal of biological chemistry* 287: 23079-94
- Berghella L, De Angelis L, De Buyscher T, Mortazavi A, Biressi S, et al. 2008. A highly conserved molecular switch binds MSY-3 to regulate myogenin repression in postnatal muscle. *Genes & development* 22: 2125-38
- Bertel O, Malessa S, Sluga E, Hornykiewicz O. 1991. Amyotrophic lateral sclerosis: changes of noradrenergic and serotonergic transmitter systems in the spinal cord. *Brain research* 566: 54-60
- Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, Tora L. 1996. hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *The EMBO journal* 15: 5022-31
- Bertuzzi M, Ampatzis K. 2018. Spinal cholinergic interneurons differentially control motoneuron excitability and alter the locomotor network operational range. *Scientific reports* 8: 1988
- Bidhendi EE, Bergh J, Zetterstrom P, Andersen PM, Marklund SL, Brannstrom T. 2016. Two superoxide dismutase prion strains transmit amyotrophic lateral sclerosis-like disease. *The Journal of clinical investigation* 126: 2249-53
- Bilsland LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L, Schiavo G. 2010. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 20523-8
- Black BL, Olson EN. 1998. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annual review of cell and developmental biology* 14: 167-96

- Blanc RS, Vogel G, Li X, Yu Z, Li S, Richard S. 2017. Arginine Methylation by PRMT1 Regulates Muscle Stem Cell Fate. *Molecular and cellular biology* 37
- Bloem B, Schoppink L, Rotaru DC, Faiz A, Hendriks P, et al. 2014. Topographic mapping between basal forebrain cholinergic neurons and the medial prefrontal cortex in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 16234-46
- Bohnen NI, Albin RL. 2011. The cholinergic system and Parkinson disease. *Behavioural brain research* 221: 564-73
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, et al. 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312: 1389-92
- Bosboom JL, Stoffers D, Wolters E. 2003. The role of acetylcholine and dopamine in dementia and psychosis in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum*: 185-95
- Bosch-Marce M, Wee CD, Martinez TL, Lipkes CE, Choe DW, et al. 2011. Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice. *Human molecular genetics* 20: 1844-53
- Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, et al. 2010a. Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Human molecular genetics* 19: 4160-75
- Bosco DA, Morfini G, Karabacak NM, Song Y, Gros-Louis F, et al. 2010b. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nature neuroscience* 13: 1396-403
- Bose JK, Huang CC, Shen CK. 2011. Regulation of autophagy by neuropathological protein TDP-43. *The Journal of biological chemistry* 286: 44441-8
- Bourke SC, Tomlinson M, Williams TL, Bullock RE, Shaw PJ, Gibson GJ. 2006. Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *The Lancet. Neurology* 5: 140-7
- Braak H, Brettschneider J, Ludolph AC, Lee VM, Trojanowski JQ, Del Tredici K. 2013. Amyotrophic lateral sclerosis--a model of corticofugal axonal spread. *Nature reviews. Neurology* 9: 708-14
- Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P. 1995. Constitutive muscular abnormalities in culture in spinal muscular atrophy. *Lancet* 345: 694-5
- Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH. 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *The EMBO journal* 8: 701-9
- Brenner D, Yilmaz R, Muller K, Grehl T, Petri S, et al. 2018. Hot-spot KIF5A mutations cause familial ALS. *Brain : a journal of neurology*
- Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, et al. 2013. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 74: 20-38
- Brites D, Vaz AR. 2014. Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. *Frontiers in cellular neuroscience* 8: 117
- Bromberg MB, Brownell AA. 2008. Motor unit number estimation in the assessment of performance and function in motor neuron disease. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America* 19: 509-32, ix

- Brooks BR. 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. *Journal of the neurological sciences* 124 Suppl: 96-107
- Brooks BR, Shodis KA, Lewis DH, Rawling JD, Sanjak M, et al. 1995. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis. Quantification of symptoms, signs, strength, and function. *Advances in neurology* 68: 163-84
- Brown RH, Jr., Al-Chalabi A. 2017. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The New England journal of medicine* 377: 1602
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, et al. 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281: 1851-4
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annual review of neuroscience* 27: 723-49
- Brusco J, Haas K. 2015. Interactions between mitochondria and the transcription factor myocyte enhancer factor 2 (MEF2) regulate neuronal structural and functional plasticity and metaplasticity. *The Journal of physiology* 593: 3471-81
- Campanari ML, Garcia-Ayllon MS, Ciura S, Saez-Valero J, Kabashi E. 2016. Neuromuscular Junction Impairment in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Reassessing the Role of Acetylcholinesterase. *Frontiers in molecular neuroscience* 9: 160
- Cappello V, Francolini M. 2017. Neuromuscular Junction Dismantling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *International journal of molecular sciences* 18
- Casas C, Herrando-Grabulosa M, Manzano R, Mancuso R, Osta R, Navarro X. 2013. Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain and behavior* 3: 145-58
- Casas C, Manzano R, Vaz R, Osta R, Brites D. 2016. Synaptic Failure: Focus in an Integrative View of ALS. *Brain plasticity* 1: 159-75
- Castonguay A, Levesque S, Robitaille R. 2001. Glial cells as active partners in synaptic functions. *Progress in brain research* 132: 227-40
- Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, et al. 1999. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *Journal of the neurological sciences* 169: 13-21
- Chand KK, Lee KM, Lee JD, Qiu H, Willis EF, et al. 2018. Defects in synaptic transmission at the neuromuscular junction precede motor deficits in a TDP-43(Q331K) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32: 2676-89
- Charville GW, Wang WL, Ingram DR, Roy A, Thomas D, et al. 2017. EWSR1 fusion proteins mediate PAX7 expression in Ewing sarcoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 30: 1312-20
- Chen H, Richard M, Sandler DP, Umbach DM, Kamel F. 2007a. Head injury and amyotrophic lateral sclerosis. *American journal of epidemiology* 166: 810-6

- Chen SL, Loffler KA, Chen D, Stallcup MR, Muscat GE. 2002. The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. *The Journal of biological chemistry* 277: 4324-33
- Chen XJ, Levedakou EN, Millen KJ, Wollmann RL, Soliven B, Popko B. 2007b. Proprioceptive sensory neuropathy in mice with a mutation in the cytoplasmic Dynein heavy chain 1 gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 14515-24
- Chen Y, Deng J, Wang P, Yang M, Chen X, et al. 2016. PINK1 and Parkin are genetic modifiers for FUS-induced neurodegeneration. *Human molecular genetics* 25: 5059-68
- Chio A, Mora G, Calvo A, Mazzini L, Bottacchi E, et al. 2009. Epidemiology of ALS in Italy: a 10-year prospective population-based study. *Neurology* 72: 725-31
- Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacene E, Roblot N, et al. 2001. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *The Journal of cell biology* 152: 1107-14
- Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, et al. 2015. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* 347: 1436-41
- Clark JA, Southam KA, Blizzard CA, King AE, Dickson TC. 2016. Axonal degeneration, distal collateral branching and neuromuscular junction architecture alterations occur prior to symptom onset in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of chemical neuroanatomy* 76: 35-47
- Cleveland DW, Rothstein JD. 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature reviews. Neuroscience* 2: 806-19
- Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, et al. 2009. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *Journal of neurochemistry* 111: 1051-61
- Corcia P, Tauber C, Vercoillie J, Arlicot N, Prunier C, et al. 2012. Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS one* 7: e52941
- Cornelison DD, Olwin BB, Rudnicki MA, Wold BJ. 2000. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Developmental biology* 224: 122-37
- Corrado L, Carlomagno Y, Falasco L, Mellone S, Godi M, et al. 2011. A novel peripherin gene (PRPH) mutation identified in one sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient. *Neurobiology of aging* 32: 552 e1-6
- Cortes CJ, Ling SC, Guo LT, Hung G, Tsunemi T, et al. 2014. Muscle expression of mutant androgen receptor accounts for systemic and motor neuron disease phenotypes in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 82: 295-307
- Cortese A, Plagnol V, Brady S, Simone R, Lashley T, et al. 2014. Widespread RNA metabolism impairment in sporadic inclusion body myositis TDP-43-proteinopathy. *Neurobiology of aging* 35: 1491-8
- Costa J, Swash M, de Carvalho M. 2012. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Archives of neurology* 69: 1410-6
- Couratier P, Corcia P, Lautrette G, Nicol M, Preux PM, Marin B. 2016. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Revue neurologique* 172: 37-45

- Crochemore C, Pena-Altamira E, Virgili M, Monti B, Contestabile A. 2005. Disease-related regressive alterations of forebrain cholinergic system in SOD1 mutant transgenic mice. *Neurochemistry international* 46: 357-68
- Crozat A, Aman P, Mandahl N, Ron D. 1993. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* 363: 640-4
- Custer SK, Neumann M, Lu H, Wright AC, Taylor JP. 2010. Transgenic mice expressing mutant forms VCP/p97 recapitulate the full spectrum of IBMPFD including degeneration in muscle, brain and bone. *Human molecular genetics* 19: 1741-55
- Cykowski MD, Powell SZ, Appel JW, Arumanayagam AS, Rivera AL, Appel SH. 2018. Phosphorylated TDP-43 (pTDP-43) aggregates in the axial skeletal muscle of patients with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica communications* 6: 28
- Czubryt MP, McAnally J, Fishman GI, Olson EN. 2003. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1711-6
- D'Agostino C, Nogalska A, Engel WK, Askanas V. 2011. In sporadic inclusion body myositis muscle fibres TDP-43-positive inclusions are less frequent and robust than p62 inclusions, and are not associated with paired helical filaments. *Neuropathology and applied neurobiology* 37: 315-20
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987-1000
- Davis SA, Itaman S, Khalid-Janney CM, Sherard JA, Dowell JA, et al. 2018. TDP-43 interacts with mitochondrial proteins critical for mitophagy and mitochondrial dynamics. *Neuroscience letters* 678: 8-15
- de Lacalle S, Hersh LB, Saper CB. 1993. Cholinergic innervation of the human cerebellum. *The Journal of comparative neurology* 328: 364-76
- Dejardin J, Kingston RE. 2009. Purification of proteins associated with specific genomic Loci. *Cell* 136: 175-86
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, et al. 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72: 245-56
- Delzor A, Couratier P, Boumediene F, Nicol M, Druet-Cabanac M, et al. 2014. Searching for a link between the L-BMAA neurotoxin and amyotrophic lateral sclerosis: a study protocol of the French BMAALS programme. *BMJ open* 4: e005528
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, et al. 2011. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477: 211-5
- Deng HX, Zhai H, Bigio EH, Yan J, Fecto F, et al. 2010. FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 67: 739-48
- Deng J, Yang M, Chen Y, Chen X, Liu J, et al. 2015. FUS Interacts with HSP60 to Promote Mitochondrial Damage. *PLoS genetics* 11: e1005357

- Dentel C, Palamiuc L, Henriques A, Lannes B, Spreux-Varoquaux O, et al. 2013. Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain : a journal of neurology* 136: 483-93
- Derave W, Van Den Bosch L, Lemmens G, Eijnde BO, Robberecht W, Hespel P. 2003. Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. *Neurobiology of disease* 13: 264-72
- Deshaies JE, Shkreta L, Moszczynski AJ, Sidibe H, Semmler S, et al. 2018. TDP-43 regulates the alternative splicing of hnRNP A1 to yield an aggregation-prone variant in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 141: 1320-33
- Desport JC, Preux PM, Truong TC, Vallat JM, Sautereau D, Couratier P. 1999. Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. *Neurology* 53: 1059-63
- Devoy A, Kalmar B, Stewart M, Park H, Burke B, et al. 2017. Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in 'FUSDelta14' knockin mice. *Brain : a journal of neurology* 140: 2797-805
- Dini Modigliani S, Morlando M, Errichelli L, Sabatelli M, Bozzoni I. 2014. An ALS-associated mutation in the FUS 3'-UTR disrupts a microRNA-FUS regulatory circuitry. *Nature communications* 5: 4335
- Distad BJ, Meekins GD, Liou LL, Weiss MD, Carter GT, Miller RG. 2008. Drug therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America* 19: 633-51, xi-xii
- Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, et al. 2008. Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell metabolism* 8: 425-36
- Doi H, Okamura K, Bauer PO, Furukawa Y, Shimizu H, et al. 2008. RNA-binding protein TLS is a major nuclear aggregate-interacting protein in huntingtin exon 1 with expanded polyglutamine-expressing cells. *The Journal of biological chemistry* 283: 6489-500
- Donnelly CJ, Zhang PW, Pham JT, Haeusler AR, Mistry NA, et al. 2013. RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron* 80: 415-28
- Dormann D, Haass C. 2011. TDP-43 and FUS: a nuclear affair. *Trends in neurosciences* 34: 339-48
- Dormann D, Haass C. 2013. Fused in sarcoma (FUS): an oncogene goes awry in neurodegeneration. *Molecular and cellular neurosciences* 56: 475-86
- Dormann D, Madl T, Valori CF, Bentmann E, Tahirovic S, et al. 2012. Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS. *The EMBO journal* 31: 4258-75
- Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, et al. 2010. ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *The EMBO journal* 29: 2841-57
- Douville R, Liu J, Rothstein J, Nath A. 2011. Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 69: 141-51
- Drachman DB, Frank K, Dykes-Hoberg M, Teismann P, Almer G, et al. 2002. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Annals of neurology* 52: 771-8

- Duclert A, Savatier N, Schaeffer L, Changeux JP. 1996. Identification of an element crucial for the sub-synaptic expression of the acetylcholine receptor epsilon-subunit gene. *The Journal of biological chemistry* 271: 17433-8
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, et al. 2008. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70: 1004-9
- Dupuis L, de Tapia M, Rene F, Lutz-Bucher B, Gordon JW, et al. 2000. Differential screening of mutated SOD1 transgenic mice reveals early up-regulation of a fast axonal transport component in spinal cord motor neurons. *Neurobiology of disease* 7: 274-85
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Eschbach J, Rene F, et al. 2009. Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS one* 4: e5390
- Dupuis L, Oudart H, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. 2004. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 11159-64
- Dupuis L, Pradat PF, Ludolph AC, Loeffler JP. 2011. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet. Neurology* 10: 75-82
- Dupuis L, Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Jullien P, Lacomblez L, et al. 2010. Platelet serotonin level predicts survival in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS one* 5: e13346
- Dziedziolowska S, Drapeau P, Armstrong GAB. 2017. Augmented quantal release of acetylcholine at the vertebrate neuromuscular junction following tdp-43 depletion. *PLoS one* 12: e0177005
- Ederle H, Dormann D. 2017. TDP-43 and FUS en route from the nucleus to the cytoplasm. *FEBS letters* 591: 1489-507
- Edmondson DG, Olson EN. 1990. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes & development* 4: 1450
- Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A. 1991. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 1349-53
- Eisen A, Schulzer M, MacNeil M, Pant B, Mak E. 1993. Duration of amyotrophic lateral sclerosis is age dependent. *Muscle & nerve* 16: 27-32
- El Oussini H, Bayer H, Scekcic-Zahirovic J, Vercruyse P, Sinniger J, et al. 2016. Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica* 131: 465-80
- El Oussini H, Scekcic-Zahirovic J, Vercruyse P, Marques C, Dirrig-Grosch S, et al. 2017. Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 82: 444-56
- Estrella NL, Desjardins CA, Nocco SE, Clark AL, Maksimenko Y, Naya FJ. 2015. MEF2 transcription factors regulate distinct gene programs in mammalian skeletal muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry* 290: 1256-68
- Fecto F, Yan J, Vemula SP, Liu E, Yang Y, et al. 2011. SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology* 68: 1440-6

- Feiguin F, Godena VK, Romano G, D'Ambrogio A, Klima R, Baralle FE. 2009. Depletion of TDP-43 affects Drosophila motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. *FEBS letters* 583: 1586-92
- Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ. 2011. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews. Neurology* 7: 616-30
- Fibiger HC. 1982. The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain research* 257: 327-88
- Fiesel FC, Kahle PJ. 2011. TDP-43 and FUS/TLS: cellular functions and implications for neurodegeneration. *The FEBS journal* 278: 3550-68
- Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, et al. 2017. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *The New England journal of medicine* 377: 1723-32
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, et al. 2004. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental neurology* 185: 232-40
- Flucher BE, Daniels MP. 1989. Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron* 3: 163-75
- Fogarty MJ, Noakes PG, Bellingham MC. 2015. Motor cortex layer V pyramidal neurons exhibit dendritic regression, spine loss, and increased synaptic excitation in the presymptomatic hSOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35: 643-7
- Forrest V, Ince P, Leitch M, Marshall EF, Shaw PJ. 1996. Serotonergic neurotransmission in the spinal cord and motor cortex of patients with motor neuron disease and controls: quantitative autoradiography for 5-HT1a and 5-HT2 receptors. *Journal of the neurological sciences* 139 Suppl: 83-90
- Forsberg K, Jonsson PA, Andersen PM, Bergemalm D, Graffmo KS, et al. 2010. Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. *PLoS one* 5: e11552
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. 2000. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 2534-42
- Frickenhaus M, Wagner M, Mallik M, Catinozzi M, Storkebaum E. 2015. Highly efficient cell-type-specific gene inactivation reveals a key function for the Drosophila FUS homolog cabeza in neurons. *Scientific reports* 5: 9107
- Fromm L, Burden SJ. 1998. Synapse-specific and neuregulin-induced transcription require an ets site that binds GABPalpha/GABPbeta. *Genes & development* 12: 3074-83
- Fu AK, Fu WY, Cheung J, Tsim KW, Ip FC, et al. 2001. Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction. *Nature neuroscience* 4: 374-81
- Fu AK, Ip FC, Fu WY, Cheung J, Wang JH, et al. 2005. Aberrant motor axon projection, acetylcholine receptor clustering, and neurotransmission in cyclin-dependent kinase 5 null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 15224-9

- Fujii R, Takumi T. 2005. TLS facilitates transport of mRNA encoding an actin-stabilizing protein to dendritic spines. *Journal of cell science* 118: 5755-65
- Fushimi K, Long C, Jayaram N, Chen X, Li L, Wu JY. 2011. Expression of human FUS/TLS in yeast leads to protein aggregation and cytotoxicity, recapitulating key features of FUS proteinopathy. *Protein & cell* 2: 141-9
- Galvagni F, Capo S, Oliviero S. 2001. Sp1 and Sp3 physically interact and co-operate with GABP for the activation of the utrophin promoter. *Journal of molecular biology* 306: 985-96
- Ganesalingam J, An J, Bowser R, Andersen PM, Shaw CE. 2013. pNfH is a promising biomarker for ALS. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration* 14: 146-9
- Ganesalingam J, An J, Shaw CE, Shaw G, Lacomis D, Bowser R. 2011. Combination of neurofilament heavy chain and complement C3 as CSF biomarkers for ALS. *Journal of neurochemistry* 117: 528-37
- Gardiner M, Toth R, Vandermoere F, Morrice NA, Rouse J. 2008. Identification and characterization of FUS/TLS as a new target of ATM. *The Biochemical journal* 415: 297-307
- Gascon E, Gao FB. 2014. The emerging roles of microRNAs in the pathogenesis of frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis (FTD-ALS) spectrum disorders. *Journal of neurogenetics* 28: 30-40
- Gayraud-Morel B, Chretien F, Flamant P, Gomes D, Zammit PS, Tajbakhsh S. 2007. A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Developmental biology* 312: 13-28
- Gerbino V, Carri MT, Cozzolino M, Achsel T. 2013. Mislocalised FUS mutants stall spliceosomal snRNPs in the cytoplasm. *Neurobiology of disease* 55: 120-8
- Gijssels I, Van Mossevelde S, van der Zee J, Sieben A, Engelborghs S, et al. 2016. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Molecular psychiatry* 21: 1112-24
- Gill SR, Schroer TA, Szilak I, Steuer ER, Sheetz MP, Cleveland DW. 1991. Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *The Journal of cell biology* 115: 1639-50
- Giordana MT, Piccinini M, Grifoni S, De Marco G, Vercellino M, et al. 2010. TDP-43 redistribution is an early event in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain pathology* 20: 351-60
- Gitler AD, Shorter J. 2011. RNA-binding proteins with prion-like domains in ALS and FTLD-U. *Prion* 5: 179-87
- Godena VK, Romano G, Romano M, Appocher C, Klima R, et al. 2011. TDP-43 regulates Drosophila neuromuscular junctions growth by modulating Futsch/MAP1B levels and synaptic microtubules organization. *PloS one* 6: e17808
- Goldstein LH, Newsom-Davis IC, Bryant V, Brammer M, Leigh PN, Simmons A. 2011. Altered patterns of cortical activation in ALS patients during attention and cognitive response inhibition tasks. *Journal of neurology* 258: 2186-98
- Gonzalez-Bermejo J, Morelot-Panzini C, Tanguy ML, Meininger V, Pradat PF, et al. 2016. Early diaphragm pacing in patients with amyotrophic lateral sclerosis (RespiStimALS): a randomised controlled triple-blind trial. *The Lancet. Neurology* 15: 1217-27

- Gonzalez de Aguilar JL, Niederhauser-Wiederkehr C, Halter B, De Tapia M, Di Scala F, et al. 2008. Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiological genomics* 32: 207-18
- Gorges M, Vercruyse P, Muller HP, Huppertz HJ, Rosenbohm A, et al. 2017. Hypothalamic atrophy is related to body mass index and age at onset in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 88: 1033-41
- Gresham LS, Molgaard CA, Golbeck AL, Smith R. 1986. Amyotrophic lateral sclerosis and occupational heavy metal exposure: a case-control study. *Neuroepidemiology* 5: 29-38
- Groen EJ, Fumoto K, Blokhuis AM, Engelen-Lee J, Zhou Y, et al. 2013. ALS-associated mutations in FUS disrupt the axonal distribution and function of SMN. *Human molecular genetics* 22: 3690-704
- Guillem K, Bloem B, Poorthuis RB, Loos M, Smit AB, et al. 2011. Nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunits in the medial prefrontal cortex control attention. *Science* 333: 888-91
- Gundersen K, Rabben I, Klocke BJ, Merlie JP. 1995. Overexpression of myogenin in muscles of transgenic mice: interaction with Id-1, negative crossregulation of myogenic factors, and induction of extrasynaptic acetylcholine receptor expression. *Molecular and cellular biology* 15: 7127-34
- Hackl W, Luhrmann R. 1996. Molecular cloning and subcellular localisation of the snRNP-associated protein 69KD, a structural homologue of the proto-oncoproteins TLS and EWS with RNA and DNA-binding properties. *Journal of molecular biology* 264: 843-51
- Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. 2003. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 7111-6
- Hayashi S, Sakurai A, Amari M, Okamoto K. 2001. Pathological study of the diffuse myelin pallor in the anterolateral columns of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 188: 3-7
- He F, Krans A, Freibaum BD, Taylor JP, Todd PK. 2014. TDP-43 suppresses CGG repeat-induced neurotoxicity through interactions with HnRNP A2/B1. *Human molecular genetics* 23: 5036-51
- Heckers S, Geula C, Mesulam MM. 1992. Cholinergic innervation of the human thalamus: dual origin and differential nuclear distribution. *The Journal of comparative neurology* 325: 68-82
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T. 2007. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease* 28: 154-64
- Henkel JS, Beers DR, Siklos L, Appel SH. 2006. The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Molecular and cellular neurosciences* 31: 427-37
- Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, et al. 2004. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Annals of neurology* 55: 221-35
- Henriquez JP, Webb A, Bence M, Bildsoe H, Sahores M, et al. 2008. Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 18812-7

- Hernandez Lain A, Millicamps S, Dubourg O, Salachas F, Bruneteau G, et al. 2011. Abnormal TDP-43 and FUS proteins in muscles of sporadic IBM: similarities in a TARDBP-linked ALS patient. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 82: 1414-6
- Hicks GG, Singh N, Nashabi A, Mai S, Bozek G, et al. 2000. Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nature genetics* 24: 175-9
- Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z. 2002. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: RC215
- Hill SJ, Mordes DA, Cameron LA, Neuberg DS, Landini S, et al. 2016. Two familial ALS proteins function in prevention/repair of transcription-associated DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: E7701-E09
- Hippenmeyer S, Huber RM, Ladle DR, Murphy K, Arber S. 2007. ETS transcription factor Erm controls subsynaptic gene expression in skeletal muscles. *Neuron* 55: 726-40
- Hofweber M, Hutten S, Bourgeois B, Spreitzer E, Niedner-Boblenz A, et al. 2018. Phase Separation of FUS Is Suppressed by Its Nuclear Import Receptor and Arginine Methylation. *Cell* 173: 706-19 e13
- Huang EJ, Zhang J, Geser F, Trojanowski JQ, Strober JB, et al. 2010. Extensive FUS-immunoreactive pathology in juvenile amyotrophic lateral sclerosis with basophilic inclusions. *Brain pathology* 20: 1069-76
- Huelga SC, Vu AQ, Arnold JD, Liang TY, Liu PP, et al. 2012. Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell reports* 1: 167-78
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, et al. 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393: 702-5
- Hyman AA, Weber CA, Julicher F. 2014. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annual review of cell and developmental biology* 30: 39-58
- Ikemoto A, Nakamura S, Akiguchi I, Hirano A. 2002. Differential expression between synaptic vesicle proteins and presynaptic plasma membrane proteins in the anterior horn of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica* 103: 179-87
- Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. 2015. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical epidemiology* 7: 181-93
- Ishigaki S, Fujioka Y, Okada Y, Riku Y, Udagawa T, et al. 2017. Altered Tau Isoform Ratio Caused by Loss of FUS and SFPQ Function Leads to FTLD-like Phenotypes. *Cell reports* 18: 1118-31
- Ismail A, Cooper-Knock J, Highley JR, Milano A, Kirby J, et al. 2013. Concurrence of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis in patients with hexanucleotide repeat expansions of C9ORF72. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 84: 79-87
- Iwahashi CK, Yasui DH, An HJ, Greco CM, Tassone F, et al. 2006. Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain : a journal of neurology* 129: 256-71
- Iwasaki H, Yada T. 2007. Protein arginine methylation regulates insulin signaling in L6 skeletal muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 364: 1015-21
- Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC. 2008. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral

- sclerosis in transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 2075-88
- Jacobs BL. 1976. An animal behavior model for studying central serotonergic synapses. *Life sciences* 19: 777-85
- Jelsone-Swain L, Persad C, Votruba KL, Weisenbach SL, Johnson T, et al. 2012. The Relationship between Depressive Symptoms, Disease State, and Cognition in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in psychology* 3: 542
- Jiang J, Cleveland DW. 2016. Bidirectional Transcriptional Inhibition as Therapy for ALS/FTD Caused by Repeat Expansion in C9orf72. *Neuron* 92: 1160-63
- Johnson JO, Pioro EP, Boehringer A, Chia R, Feit H, et al. 2014. Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature neuroscience* 17: 664-66
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Dimou L, Lin S, Fergani A, et al. 2006. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO reports* 7: 1162-7
- Jones D, Round J, De Haan A. 2005. *Physiologie du muscle squelettique: de la structure au mouvement*.
- Jones G, Moore C, Hashemolhosseini S, Brenner HR. 1999. Constitutively active MuSK is clustered in the absence of agrin and induces ectopic post synaptic-like membranes in skeletal muscle fibers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 3376-83
- Joyce NC, Carter GT. 2013. Electrodiagnosis in persons with amyotrophic lateral sclerosis. *PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation* 5: S89-95
- Julien JP. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104: 581-91
- Kabashi E, Bercier V, Lissouba A, Liao M, Brustein E, et al. 2011. FUS and TARDBP but not SOD1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS genetics* 7: e1002214
- Kabuta T, Suzuki Y, Wada K. 2006. Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 281: 30524-33
- Kamelgarn M, Chen J, Kuang L, Arenas A, Zhai J, et al. 2016. Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS. *Biochimica et biophysica acta* 1862: 2004-14
- Kanai K, Kuwabara S, Misawa S, Tamura N, Ogawara K, et al. 2006. Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain : a journal of neurology* 129: 953-62
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43: 513-25
- Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, et al. 2013. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature neuroscience* 16: 571-9
- Kato T. 1989. Choline acetyltransferase activities in single spinal motor neurons from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* 52: 636-40
- Kaushal S, Schneider JW, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. 1994. Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science* 266: 1236-40

- Kedage V, Selvaraj N, Nicholas TR, Budka JA, Plotnik JP, et al. 2016. An Interaction with Ewing's Sarcoma Breakpoint Protein EWS Defines a Specific Oncogenic Mechanism of ETS Factors Rearranged in Prostate Cancer. *Cell reports* 17: 1289-301
- Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, et al. 2013. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495: 467-73
- Kim SJ, Yoo BC, Uhm CS, Lee SW. 2011. Posttranslational arginine methylation of lamin A/C during myoblast fusion. *Biochimica et biophysica acta* 1814: 308-17
- King IN, Yartseva V, Salas D, Kumar A, Heidersbach A, et al. 2014. The RNA-binding protein TDP-43 selectively disrupts microRNA-1/206 incorporation into the RNA-induced silencing complex. *The Journal of biological chemistry* 289: 14263-71
- Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Doi H, et al. 2016. FUS/TLS acts as an aggregation-dependent modifier of polyglutamine disease model mice. *Scientific reports* 6: 35236
- Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, et al. 2015. FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica communications* 3: 24
- Ko CP, Robitaille R. 2015. Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7: a020503
- Koike S, Schaeffer L, Changeux JP. 1995. Identification of a DNA element determining synaptic expression of the mouse acetylcholine receptor delta-subunit gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 10624-8
- Konrad C, Jansen A, Henningsen H, Sommer J, Turski PA, et al. 2006. Subcortical reorganization in amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental brain research* 172: 361-9
- Kraya T, Schmidt B, Muller T, Hanisch F. 2015. Impairment of respiratory function in late-onset distal myopathy due to MATR3 Mutation. *Muscle & nerve* 51: 916-8
- Kuang S, Charge SB, Seale P, Huh M, Rudnicki MA. 2006. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *The Journal of cell biology* 172: 103-13
- Kurland LT. 1988. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin. *Trends in neurosciences* 11: 51-4
- Kuroda M, Sok J, Webb L, Baechtold H, Urano F, et al. 2000. Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(-/-) mice. *The EMBO journal* 19: 453-62
- Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, et al. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323: 1205-8
- Lacazette E, Le Calvez S, Gajendran N, Brenner HR. 2003. A novel pathway for MuSK to induce key genes in neuromuscular synapse formation. *The Journal of cell biology* 161: 727-36
- Lagier-Tourenne C, Baughn M, Rigo F, Sun S, Liu P, et al. 2013. Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: E4530-9
- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. 2010. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human molecular genetics* 19: R46-64

- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Hutt KR, Vu AQ, Baughn M, et al. 2012. Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nature neuroscience* 15: 1488-97
- LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, et al. 2002. Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 34: 715-27
- Landers JE, Melki J, Meininger V, Glass JD, van den Berg LH, et al. 2009. Reduced expression of the Kinesin-Associated Protein 3 (KIFAP3) gene increases survival in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 9004-9
- Lanson NA, Jr., Maltare A, King H, Smith R, Kim JH, et al. 2011. A Drosophila model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43. *Human molecular genetics* 20: 2510-23
- Lattante S, Rouleau GA, Kabashi E. 2013. TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Human mutation* 34: 812-26
- Le Grand F, Rudnicki MA. 2007. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current opinion in cell biology* 19: 628-33
- Lee BJ, Cansizoglu AE, Suel KE, Louis TH, Zhang Z, Chook YM. 2006. Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* 126: 543-58
- Lee Y, Rudell J, Ferns M. 2009. Rapsyn interacts with the muscle acetylcholine receptor via alpha-helical domains in the alpha, beta, and epsilon subunit intracellular loops. *Neuroscience* 163: 222-32
- Lehmer C, Schludi MH, Ransom L, Greiling J, Junghanel M, et al. 2018. A novel CHCHD10 mutation implicates a Mia40-dependent mitochondrial import deficit in ALS. *EMBO molecular medicine* 10
- Leung CL, He CZ, Kaufmann P, Chin SS, Naini A, et al. 2004. A pathogenic peripherin gene mutation in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain pathology* 14: 290-6
- Li X, Decker M, Westendorf JJ. 2010. TETHERed to Runx: novel binding partners for runx factors. *Blood cells, molecules & diseases* 45: 82-5
- Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Appel SH. 2012. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental neurology* 237: 147-52
- Lin JC, Tarn WY. 2011. RBM4 down-regulates PTB and antagonizes its activity in muscle cell-specific alternative splicing. *The Journal of cell biology* 193: 509-20
- Lin W, Dominguez B, Yang J, Aryal P, Brandon EP, et al. 2005. Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron* 46: 569-79
- Lin Y, Protter DS, Rosen MK, Parker R. 2015. Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Molecular cell* 60: 208-19
- Lindauer E, Dupuis L, Muller HP, Neumann H, Ludolph AC, Kassubek J. 2013. Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS one* 8: e67783
- Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. 2013. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79: 416-38

- Lino MM, Schneider C, Caroni P. 2002. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 4825-32
- Liu N, Nelson BR, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Richardson JA, et al. 2014. Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 4109-14
- Liu TY, Chen YC, Jong YJ, Tsai HJ, Lee CC, et al. 2017. Muscle developmental defects in heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A1 knockout mice. *Open biology* 7
- Liu X, Niu C, Ren J, Zhang J, Xie X, et al. 2013. The RRM domain of human fused in sarcoma protein reveals a non-canonical nucleic acid binding site. *Biochimica et biophysica acta* 1832: 375-85
- Ljubicic V, Khogali S, Renaud JM, Jasmin BJ. 2012. Chronic AMPK stimulation attenuates adaptive signaling in dystrophic skeletal muscle. *American journal of physiology. Cell physiology* 302: C110-21
- Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, et al. 2009. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 4465-70
- Loeffler JP, Picchiarelli G, Dupuis L, Gonzalez De Aguilar JL. 2016. The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain pathology* 26: 227-36
- Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, Kramer JH, Olney RK, Miller B. 2003. Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology* 60: 1094-7
- Lopez-Gonzalez R, Lu Y, Gendron TF, Karydas A, Tran H, et al. 2016. Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron* 92: 383-91
- Lourenco GF, Janitz M, Huang Y, Halliday GM. 2015. Long noncoding RNAs in TDP-43 and FUS/TLS-related frontotemporal lobar degeneration (FTLD). *Neurobiology of disease* 82: 445-54
- Lu J, McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. 2000. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Molecular cell* 6: 233-44
- Luo G, Yi J, Ma C, Xiao Y, Yi F, et al. 2013. Defective mitochondrial dynamics is an early event in skeletal muscle of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *PloS one* 8: e82112
- Macchi Z, Wang Y, Moore D, Katz J, Saperstein D, et al. 2015. A multi-center screening trial of rasagiline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Possible mitochondrial biomarker target engagement. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration* 16: 345-52
- Machamer JB, Collins SE, Lloyd TE. 2014. The ALS gene FUS regulates synaptic transmission at the Drosophila neuromuscular junction. *Human molecular genetics* 23: 3810-22
- Mackenzie IR, Ansorge O, Strong M, Bilbao J, Zinman L, et al. 2011. Pathological heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations: two distinct patterns correlating with disease severity and mutation. *Acta neuropathologica* 122: 87-98
- Macpherson P, Kostrominova T, Tang H, Goldman D. 2002. Protein kinase C and calcium/calmodulin-activated protein kinase II (CaMK II) suppress nicotinic acetylcholine

- receptor gene expression in mammalian muscle. A specific role for CaMK II in activity-dependent gene expression. *The Journal of biological chemistry* 277: 15638-46
- Magrane J, Cortez C, Gan WB, Manfredi G. 2014. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP-43 ALS mouse models. *Human molecular genetics* 23: 1413-24
- Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, et al. 2012. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *The Lancet. Neurology* 11: 323-30
- Malek AM, Barchowsky A, Bowser R, Youk A, Talbott EO. 2012. Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis of epidemiological studies: pesticide exposure as a risk factor for ALS. *Environmental research* 117: 112-9
- Mann DM, Rollinson S, Robinson A, Bennion Callister J, Thompson JC, et al. 2013. Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta neuropathologica communications* 1: 68
- Manzano R, Toivonen JM, Olivan S, Calvo AC, Moreno-Igoa M, et al. 2011. Altered expression of myogenic regulatory factors in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative diseases* 8: 386-96
- Marcuzzo S, Zucca I, Mastropietro A, de Rosbo NK, Cavalcante P, et al. 2011. Hind limb muscle atrophy precedes cerebral neuronal degeneration in G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a longitudinal MRI study. *Experimental neurology* 231: 30-7
- Marin B, Desport JC, Kajeu P, Jesus P, Nicolaud B, et al. 2011. Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 82: 628-34
- Mariosa D, Beard JD, Umbach DM, Bellocco R, Keller J, et al. 2017. Body Mass Index and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Study of US Military Veterans. *American journal of epidemiology* 185: 362-71
- Mariosa D, Kamel F, Bellocco R, Ye W, Fang F. 2015. Association between diabetes and amyotrophic lateral sclerosis in Sweden. *European journal of neurology* 22: 1436-42
- Martinez TL, Kong L, Wang X, Osborne MA, Crowder ME, et al. 2012. Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32: 8703-15
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, et al. 2010. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465: 223-6
- Mastrocola AS, Kim SH, Trinh AT, Rodenkirch LA, Tibbetts RS. 2013. The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 288: 24731-41
- Matsumoto T, Matsukawa K, Watanabe N, Kishino Y, Kunugi H, et al. 2018. Self-assembly of FUS through its low-complexity domain contributes to neurodegeneration. *Human molecular genetics* 27: 1353-65
- McCall RB, Aghajanian GK. 1979. Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain research* 169: 11-27

- McComas AJ, Fawcett PR, Campbell MJ, Sica RE. 1971. Electrophysiological estimation of the number of motor units within a human muscle. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 34: 121-31
- McDermott CJ, Stavroulakis T. 2015. Gastrostomy in amyotrophic lateral sclerosis: effects of non-invasive ventilation - Authors' reply. *The Lancet. Neurology* 14: 1153
- Meier T, Masciulli F, Moore C, Schoumacher F, Eppenberger U, et al. 1998. Agrin can mediate acetylcholine receptor gene expression in muscle by aggregation of muscle-derived neuregulins. *The Journal of cell biology* 141: 715-26
- Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. 2010. Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1beta accelerates ALS pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 13046-50
- Meissner M, Lopato S, Gotzmann J, Sauermann G, Barta A. 2003. Proto-oncoprotein TLS/FUS is associated to the nuclear matrix and complexed with splicing factors PTB, SRm160, and SR proteins. *Experimental cell research* 283: 184-95
- Mejat A, Ramond F, Bassel-Duby R, Khochbin S, Olson EN, Schaeffer L. 2005. Histone deacetylase 9 couples neuronal activity to muscle chromatin acetylation and gene expression. *Nature neuroscience* 8: 313-21
- Mendelzon D, Changeux JP, Nghiem HO. 1994. Phosphorylation of myogenin in chick myotubes: regulation by electrical activity and by protein kinase C. Implications for acetylcholine receptor gene expression. *Biochemistry* 33: 2568-75
- Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZM, et al. 2002. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 125: 1522-33
- Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, et al. 2018. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *The New England journal of medicine* 378: 625-35
- Merrilees J, Klapper J, Murphy J, Lomen-Hoerth C, Miller BL. 2010. Cognitive and behavioral challenges in caring for patients with frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 11: 298-302
- Merz S, Westermann B. 2009. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome biology* 10: R95
- Mesulam M, Shaw P, Mash D, Weintraub S. 2004. Cholinergic nucleus basalis tauopathy emerges early in the aging-MCI-AD continuum. *Annals of neurology* 55: 815-28
- Mesulam MM. 2013. Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in Alzheimer's disease. *The Journal of comparative neurology* 521: 4124-44
- Mesulam MM, Mash D, Hersh L, Bothwell M, Geula C. 1992. Cholinergic innervation of the human striatum, globus pallidus, subthalamic nucleus, substantia nigra, and red nucleus. *The Journal of comparative neurology* 323: 252-68
- Miguel L, Avequin T, Delarue M, Feuillet S, Frebourg T, et al. 2012. Accumulation of insoluble forms of FUS protein correlates with toxicity in *Drosophila*. *Neurobiology of aging* 33: 1008 e1-15

- Milan L, Courtand G, Carroit L, Masméjean F, Barriere G, et al. 2015. Age-Related Changes in Pre- and Postsynaptic Partners of the Cholinergic C-Boutons in Wild-Type and SOD1G93A Lumbar Motoneurons. *PLoS one* 10: e0135525
- Miles GB, Hartley R, Todd AJ, Brownstone RM. 2007. Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 2448-53
- Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH. 2007. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *The Cochrane database of systematic reviews*: CD001447
- Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umapathi P, et al. 2006. Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 19546-51
- Miller TM, Pestronk A, David W, Rothstein J, Simpson E, 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. *The Lancet. Neurology* 12: 435-42
- Mirra A, Rossi S, Scaricamazza S, Di Salvio M, Salvatori I, et al. 2017. Functional interaction between FUS and SMN underlies SMA-like splicing changes in wild-type hFUS mice. *Scientific reports* 7: 2033
- Mitchell JC, Constable R, So E, Vance C, Scotter E, et al. 2015. Wild type human TDP-43 potentiates ALS-linked mutant TDP-43 driven progressive motor and cortical neuron degeneration with pathological features of ALS. *Acta neuropathologica communications* 3: 36
- Mitchell JC, McGoldrick P, Vance C, Hortobagyi T, Sreedharan J, et al. 2013. Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta neuropathologica* 125: 273-88
- Molkentin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. 1995. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83: 1125-36
- Moller A, Bauer CS, Cohen RN, Webster CP, De Vos KJ. 2017. Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant SOD1 inhibits anterograde axonal transport of mitochondria by reducing Miro1 levels. *Human molecular genetics* 26: 4668-79
- Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, et al. 2015. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell* 163: 123-33
- Moloney C, Rayaprolu S, Howard J, Fromholt S, Brown H, et al. 2016. Transgenic mice overexpressing the ALS-linked protein Matrin 3 develop a profound muscle phenotype. *Acta neuropathologica communications* 4: 122
- Monaco F, Fumero S, Mondino A, Mutani R. 1979. Plasma and cerebrospinal fluid tryptophan in multiple sclerosis and degenerative diseases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 42: 640-1
- Monahan Z, Ryan VH, Janke AM, Burke KA, Rhoads SN, et al. 2017. Phosphorylation of the FUS low-complexity domain disrupts phase separation, aggregation, and toxicity. *The EMBO journal* 36: 2951-67

- Monks DA, Johansen JA, Mo K, Rao P, Eagleson B, et al. 2007. Overexpression of wild-type androgen receptor in muscle recapitulates polyglutamine disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 18259-64
- Morfini GA, Burns M, Binder LI, Kanaan NM, LaPointe N, et al. 2009. Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 12776-86
- Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, et al. 2013. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science* 339: 1335-8
- Morimoto N, Nagai M, Ohta Y, Miyazaki K, Kurata T, et al. 2007. Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain research* 1167: 112-7
- Morlando M, Dini Modigliani S, Torrelli G, Rosa A, Di Carlo V, et al. 2012. FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. *The EMBO journal* 31: 4502-10
- Morohoshi F, Ootsuka Y, Arai K, Ichikawa H, Mitani S, et al. 1998. Genomic structure of the human RBP56/hTAFII68 and FUS/TLS genes. *Gene* 221: 191-8
- Mostaqul Huq MD, Gupta P, Tsai NP, White R, Parker MG, Wei LN. 2006. Suppression of receptor interacting protein 140 repressive activity by protein arginine methylation. *The EMBO journal* 25: 5094-104
- Munch C, O'Brien J, Bertolotti A. 2011. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 3548-53
- Murakami T, Qamar S, Lin JQ, Schierle GS, Rees E, et al. 2015. ALS/FTD Mutation-Induced Phase Transition of FUS Liquid Droplets and Reversible Hydrogels into Irreversible Hydrogels Impairs RNP Granule Function. *Neuron* 88: 678-90
- Murakami T, Yang SP, Xie L, Kawano T, Fu D, et al. 2012. ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism. *Human molecular genetics* 21: 1-9
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, et al. 2007. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature neuroscience* 10: 615-22
- Nagao M, Misawa H, Kato S, Hirai S. 1998. Loss of cholinergic synapses on the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 57: 329-33
- Nagata Y, Partridge TA, Matsuda R, Zammit PS. 2006. Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *The Journal of cell biology* 174: 245-53
- Naya FJ, Black BL, Wu H, Bassel-Duby R, Richardson JA, et al. 2002. Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nature medicine* 8: 1303-9
- Nedergaard S, Engberg I, Flatman JA. 1987. The modulation of excitatory amino acid responses by serotonin in the cat neocortex in vitro. *Cellular and molecular neurobiology* 7: 367-79
- Neumann M, Kwong LK, Lee EB, Kremmer E, Flatley A, et al. 2009a. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta neuropathologica* 117: 137-49

- Neumann M, Rademakers R, Roeber S, Baker M, Kretzschmar HA, Mackenzie IR. 2009b. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain : a journal of neurology* 132: 2922-31
- Neumann M, Roeber S, Kretzschmar HA, Rademakers R, Baker M, Mackenzie IR. 2009c. Abundant FUS-immunoreactive pathology in neuronal intermediate filament inclusion disease. *Acta neuropathologica* 118: 605-16
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, et al. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130-3
- Ngo ST, Cole RN, Sunn N, Phillips WD, Noakes PG. 2012. Neuregulin-1 potentiates agrin-induced acetylcholine receptor clustering through muscle-specific kinase phosphorylation. *Journal of cell science* 125: 1531-43
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. 2001. Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1beta in neurodegeneration. *Annals of neurology* 50: 630-9
- Nicolas A, Kenna KP, Renton AE, Ticozzi N, Faghri F, et al. 2018. Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. *Neuron* 97: 1268-83 e6
- Niebroj-Dobosz I, Rafalowska J, Fidzianska A, Gadamski R, Grieb P. 2007. Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in SOD1G93A transgenic rats. *Folia neuropathologica* 45: 236-41
- Nomura T, Watanabe S, Kaneko K, Yamanaka K, Nukina N, Furukawa Y. 2014. Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry* 289: 1192-202
- Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, et al. 2013. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell reports* 4: 124-34
- O'Reilly EJ, Wang H, Weisskopf MG, Fitzgerald KC, Falcone G, et al. 2013. Premorbid body mass index and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration* 14: 205-11
- Oakes JA, Davies MC, Collins MO. 2017. TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. *Molecular brain* 10: 5
- Okada K, Inoue A, Okada M, Murata Y, Kakuta S, et al. 2006. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 312: 1802-5
- Okamoto S, Li Z, Ju C, Scholzke MN, Mathews E, et al. 2002. Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 3974-9
- Olguin HC, Yang Z, Tapscott SJ, Olwin BB. 2007. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *The Journal of cell biology* 177: 769-79
- Onesto E, Colombrita C, Gumina V, Borghi MO, Dusi S, et al. 2016. Gene-specific mitochondria dysfunctions in human TARDBP and C9ORF72 fibroblasts. *Acta neuropathologica communications* 4: 47
- Orban P, Devon RS, Hayden MR, Leavitt BR. 2007. Chapter 15 Juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Handbook of clinical neurology* 82: 301-12

- Ornatsky OI, Andreucci JJ, McDermott JC. 1997. A dominant-negative form of transcription factor MEF2 inhibits myogenesis. *The Journal of biological chemistry* 272: 33271-8
- Orozco D, Tahirovic S, Rentzsch K, Schwenk BM, Haass C, Edbauer D. 2012. Loss of fused in sarcoma (FUS) promotes pathological Tau splicing. *EMBO reports* 13: 759-64
- Ozdinler PH, Benn S, Yamamoto TH, Guzel M, Brown RH, Jr., Macklis JD. 2011. Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 4166-77
- Ozsancak C, Parais AM, Auzou P. 2002. [Perceptual analysis of dysarthria: presentation and validation of a clinical scale. Preliminary study]. *Revue neurologique* 158: 431-8
- Paganoni S, Deng J, Jaffa M, Cudkovicz ME, Wills AM. 2011. Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve* 44: 20-4
- Palamiuc L, Schlagowski A, Ngo ST, Vernay A, Dirrig-Grosch S, 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 molecular medicine* 7: 526-46
- Pandey UB, Nichols CD. 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews* 63: 411-36
- Park JH, Kang HJ, Lee YK, Kang H, Kim J, et al. 2015. Inactivation of EWS reduces PGC-1alpha protein stability and mitochondrial homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 6074-9
- Park KH, Vincent I. 2008. Presymptomatic biochemical changes in hindlimb muscle of G93A human Cu/Zn superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et biophysica acta* 1782: 462-8
- Parkhouse WS, Cunningham L, McFee I, Miller JM, Whitney D, et al. 2008. Neuromuscular dysfunction in the mutant superoxide dismutase mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 9: 24-34
- Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, et al. 2006. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 67: 1074-7
- Patel A, Lee HO, Jawerth L, Maharana S, Jahnke M, et al. 2015. A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* 162: 1066-77
- Pedrini S, Sau D, Guareschi S, Bogush M, Brown RH, Jr., et al. 2010. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Human molecular genetics* 19: 2974-86
- Penn BH, Bergstrom DA, Dilworth FJ, Bengal E, Tapscott SJ. 2004. A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation. *Genes & development* 18: 2348-53
- Pensato V, Tiloca C, Corrado L, Bertolin C, Sardone V, et al. 2015. TUBA4A gene analysis in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: identification of novel mutations. *Journal of neurology* 262: 1376-8
- Perdiguero E, Ruiz-Bonilla V, Gresh L, Hui L, Ballestar E, et al. 2007. Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *The EMBO journal* 26: 1245-56

- Perez-Garcia MJ, Burden SJ. 2012. Increasing MuSK activity delays denervation and improves motor function in ALS mice. *Cell reports* 2: 497-502
- Perez-Lloret S, Barrantes FJ. 2016. Deficits in cholinergic neurotransmission and their clinical correlates in Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's disease* 2: 16001
- Perlson E, Jeong GB, Ross JL, Dixit R, Wallace KE, et al. 2009. A switch in retrograde signaling from survival to stress in rapid-onset neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 9903-17
- Perrie WT, Lee GT, Curtis EM, Sparke J, Buller JR, Rossi ML. 1993. Changes in the myelinated axons of femoral nerve in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neural transmission. Supplementum* 39: 223-33
- Peters OM, Ghasemi M, Brown RH, Jr. 2015. Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. *The Journal of clinical investigation* 125: 2548
- Phillips JB, Westerfield M. 2014. Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Disease models & mechanisms* 7: 739-43
- Pisconti A, Brunelli S, Di Padova M, De Palma C, Deponti D, et al. 2006. Follistatin induction by nitric oxide through cyclic GMP: a tightly regulated signaling pathway that controls myoblast fusion. *The Journal of cell biology* 172: 233-44
- Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, et al. 2011. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature neuroscience* 14: 459-68
- Pompl PN, Ho L, Bianchi M, McManus T, Qin W, Pasinetti GM. 2003. A therapeutic role for cyclooxygenase-2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17: 725-7
- Potthoff MJ, Olson EN. 2007. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134: 4131-40
- Pramatarova A, Laganier J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. 2001. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 3369-74
- Prpar Mihevc S, Pavlin M, Darovic S, Zivin M, Podbregar M, et al. 2017. Modelling FUS Mislocalisation in an In Vitro Model of Innervated Human Muscle. *Journal of molecular neuroscience : MN* 62: 318-28
- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, et al. 2003. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nature genetics* 33: 455-6
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. 2006. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nature neuroscience* 9: 408-19
- Pupillo E, Messina P, Giussani G, Logroscino G, Zoccolella S, et al. 2014a. Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: a European population-based case-control study. *Annals of neurology* 75: 708-16
- Pupillo E, Messina P, Logroscino G, Beghi E, Group S. 2014b. Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Annals of neurology* 75: 287-97

- Qiu H, Lee S, Shang Y, Wang WY, Au KF, et al. 2014. ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects. *The Journal of clinical investigation* 124: 981-99
- Raczynska KD, Ruepp MD, Brzek A, Reber S, Romeo V, et al. 2015. FUS/TLS contributes to replication-dependent histone gene expression by interaction with U7 snRNPs and histone-specific transcription factors. *Nucleic acids research* 43: 9711-28
- Rademakers R, Stewart H, DeJesus-Hernandez M, Krieger C, Graff-Radford N, et al. 2010. Fus gene mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve* 42: 170-6
- Radunovic A, Mitsumoto H, Leigh PN. 2007. Clinical care of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet. Neurology* 6: 913-25
- Ravel-Chapuis A, Vandromme M, Thomas JL, Schaeffer L. 2007. Postsynaptic chromatin is under neural control at the neuromuscular junction. *The EMBO journal* 26: 1117-28
- Ravits J, Appel S, Baloh RH, Barohn R, Brooks BR, et al. 2013. Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: what phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration* 14 Suppl 1: 5-18
- Ravits J, Laurie P, Fan Y, Moore DH. 2007. Implications of ALS focality: rostral-caudal distribution of lower motor neuron loss postmortem. *Neurology* 68: 1576-82
- Ravits JM, La Spada AR. 2009. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology* 73: 805-11
- Ray SS, Nowak RJ, Strokovich K, Brown RH, Jr., Walz T, Lansbury PT, Jr. 2004. An intersubunit disulfide bond prevents in vitro aggregation of a superoxide dismutase-1 mutant linked to familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemistry* 43: 4899-905
- Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, et al. 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *The Journal of cell biology* 172: 91-102
- Renton AE, Chio A, Traynor BJ. 2014. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature neuroscience* 17: 17-23
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, et al. 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72: 257-68
- Rhodes SJ, Konieczny SF. 1989. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes & development* 3: 2050-61
- Ribeiro-do-Valle LE, Metzler CW, Jacobs BL. 1991. Facilitation of masseter EMG and masseteric (jaw-closure) reflex by serotonin in behaving cats. *Brain research* 550: 197-204
- Richter B, Sliter DA, Herhaus L, Stolz A, Wang C, et al. 2016. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 4039-44
- Robinson HK, Deykin AV, Bronovitsky EV, Ovchinnikov RK, Ustyugov AA, et al. 2015. Early lethality and neuronal proteinopathy in mice expressing cytoplasm-targeted FUS that lacks the RNA recognition motif. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration* 16: 402-9

- Rocha MC, Pousinha PA, Correia AM, Sebastiao AM, Ribeiro JA. 2013. Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS one* 8: e73846
- Rogers RS, Tungtur S, Tanaka T, Nadeau LL, Badawi Y, et al. 2017. Impaired Mitophagy Plays a Role in Denervation of Neuromuscular Junctions in ALS Mice. *Frontiers in neuroscience* 11: 473
- Rohrer JD, Isaacs AM, Mizielinska S, Mead S, Lashley T, et al. 2015. C9orf72 expansions in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet. Neurology* 14: 291-301
- Romano G, Klima R, Buratti E, Verstreken P, Baralle FE, Feiguin F. 2014. Chronological requirements of TDP-43 function in synaptic organization and locomotive control. *Neurobiology of disease* 71: 95-109
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62
- Rulten SL, Rotheray A, Green RL, Grundy GJ, Moore DA, et al. 2014. PARP-1 dependent recruitment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated protein FUS/TLS to sites of oxidative DNA damage. *Nucleic acids research* 42: 307-14
- Ryu HH, Jun MH, Min KJ, Jang DJ, Lee YS, et al. 2014. Autophagy regulates amyotrophic lateral sclerosis-linked fused in sarcoma-positive stress granules in neurons. *Neurobiology of aging* 35: 2822-31
- Saba L, Viscomi MT, Caioli S, Pignataro A, Bisicchia E, et al. 2016. Altered Functionality, Morphology, and Vesicular Glutamate Transporter Expression of Cortical Motor Neurons from a Presymptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cerebral cortex* 26: 1512-28
- Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Seale P, Asakura A, Rudnicki MA. 1999. Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *The Journal of cell biology* 144: 631-43
- Salajegheh M, Pinkus JL, Taylor JP, Amato AA, Nazareno R, et al. 2009. Sarcoplasmic redistribution of nuclear TDP-43 in inclusion body myositis. *Muscle & nerve* 40: 19-31
- Sanchez-Ramos C, Tierrez A, Fabregat-Andres O, Wild B, Sanchez-Cabo F, et al. 2011. PGC-1alpha regulates translocated in liposarcoma activity: role in oxidative stress gene expression. *Antioxidants & redox signaling* 15: 325-37
- Sandrock AW, Jr., Dryer SE, Rosen KM, Gozani SN, Kramer R, et al. 1997. Maintenance of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction in vivo. *Science* 276: 599-603
- Sanes JR, Lichtman JW. 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual review of neuroscience* 22: 389-442
- Sanes JR, Lichtman JW. 2001. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nature reviews. Neuroscience* 2: 791-805
- Sasaki S, Iwata M. 2007. Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66: 10-6

- Scaramuzzino C, Monaghan J, Milioto C, Lanson NA, Jr., Maltare A, et al. 2013. Protein arginine methyltransferase 1 and 8 interact with FUS to modify its sub-cellular distribution and toxicity in vitro and in vivo. *PLoS one* 8: e61576
- Scekic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, Wagner M, et al. 2017. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica* 133: 887-906
- Scekic-Zahirovic J, Sendscheid O, El Oussini H, Jambeau M, Sun Y, et al. 2016. Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *The EMBO journal* 35: 1077-97
- Schaeffer L, de Kerchove d'Exaerde A, Changeux JP. 2001. Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron* 31: 15-22
- Schiaffino S, Dyar KA, Calabria E. 2018. Skeletal muscle mass is controlled by the MRF4-MEF2 axis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 21: 164-67
- Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews* 91: 1447-531
- Schmidt N, Akaaboune M, Gajendran N, Martinez-Pena y Valenzuela I, Wakefield S, et al. 2011. Neuregulin/ErbB regulate neuromuscular junction development by phosphorylation of alpha-dystrobrevin. *The Journal of cell biology* 195: 1171-84
- Schoenfeld MA, Tempelmann C, Gaul C, Kuhnel GR, Duzel E, et al. 2005. Functional motor compensation in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology* 252: 944-52
- Schwartz JC, Cech TR, Parker RR. 2015. Biochemical Properties and Biological Functions of FET Proteins. *Annual review of biochemistry* 84: 355-79
- Schwartz JC, Ebmeier CC, Podell ER, Heimiller J, Taatjes DJ, Cech TR. 2012. FUS binds the CTD of RNA polymerase II and regulates its phosphorylation at Ser2. *Genes & development* 26: 2690-5
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102: 777-86
- Sellier C, Campanari ML, Julie Corbier C, Gaucherot A, Kolb-Cheynel I, et al. 2016. Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *The EMBO journal* 35: 1276-97
- Senda J, Kato S, Kaga T, Ito M, Atsuta N, et al. 2011. Progressive and widespread brain damage in ALS: MRI voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging study. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 12: 59-69
- Senderek J, Garvey SM, Krieger M, Guergueltcheva V, Urtizberea A, et al. 2009. Autosomal-dominant distal myopathy associated with a recurrent missense mutation in the gene encoding the nuclear matrix protein, matrin 3. *American journal of human genetics* 84: 511-8
- Shafey D, Cote PD, Kothary R. 2005. Hypomorphic Smn knockdown C2C12 myoblasts reveal intrinsic defects in myoblast fusion and myotube morphology. *Experimental cell research* 311: 49-61
- Shang Y, Huang EJ. 2016. Mechanisms of FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research* 1647: 65-78

- Shanmukha S, Narayanappa G, Nalini A, Alladi PA, Raju TR. 2018. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis (SALS) - skeletal muscle response to cerebrospinal fluid from SALS patients in a rat model. *Disease models & mechanisms* 11
- Sharma A, Lyashchenko AK, Lu L, Nasrabady SE, Elmaleh M, et al. 2016. ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nature communications* 7: 10465
- Shelkovnikova TA, Peters OM, Deykin AV, Connor-Robson N, Robinson H, et al. 2013. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 288: 25266-74
- Si J, Wang Q, Mei L. 1999. Essential roles of c-JUN and c-JUN N-terminal kinase (JNK) in neuregulin-increased expression of the acetylcholine receptor epsilon-subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 8498-508
- Smith R, Chung H, Rundquist S, Maat-Schieman ML, Colgan L, et al. 2006. Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Human molecular genetics* 15: 3119-31
- Smith R, Piro E, Myers K, Sirdofsky M, Goslin K, et al. 2017. Enhanced Bulbar Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis: The Nuedexta Treatment Trial. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 14: 762-72
- Snyder CM, Rice AL, Estrella NL, Held A, Kandarian SC, Naya FJ. 2013. MEF2A regulates the Gtl2-Dio3 microRNA mega-cluster to modulate WNT signaling in skeletal muscle regeneration. *Development* 140: 31-42
- So E, Mitchell JC, Memmi C, Chennell G, Vizcay-Barrena G, et al. 2018. Mitochondrial abnormalities and disruption of the neuromuscular junction precede the clinical phenotype and motor neuron loss in hFUSWT transgenic mice. *Human molecular genetics* 27: 463-74
- Sofola OA, Jin P, Qin Y, Duan R, Liu H, et al. 2007. RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a Drosophila model of FXTAS. *Neuron* 55: 565-71
- Soo KY, Sultana J, King AE, Atkinson R, Warraich ST, et al. 2015. ALS-associated mutant FUS inhibits macroautophagy which is restored by overexpression of Rab1. *Cell death discovery* 1: 15030
- Sorenson EJ. 2012. The electrophysiology of the motor neuron diseases. *Neurologic clinics* 30: 605-20
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, et al. 1987. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237: 517-22
- Stanton BR, Williams VC, Leigh PN, Williams SC, Blain CR, et al. 2007. Altered cortical activation during a motor task in ALS. Evidence for involvement of central pathways. *Journal of neurology* 254: 1260-7
- Stoica R, Paillusson S, Gomez-Suaga P, Mitchell JC, Lau DH, et al. 2016. ALS/FTD-associated FUS activates GSK-3beta to disrupt the VAPB-PTPIP51 interaction and ER-mitochondria associations. *EMBO reports* 17: 1326-42

- Straub IR, Janer A, Weraarpachai W, Zinman L, Robertson J, et al. 2018. Loss of CHCHD10-CHCHD2 complexes required for respiration underlies the pathogenicity of a CHCHD10 mutation in ALS. *Human molecular genetics* 27: 178-89
- Strochlic L, Cartaud A, Mejat A, Grailhe R, Schaeffer L, et al. 2004. 14-3-3 gamma associates with muscle specific kinase and regulates synaptic gene transcription at vertebrate neuromuscular synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 18189-94
- Strochlic L, Falk J, Goillot E, Sigoillot S, Bourgeois F, et al. 2012. Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction. *PloS one* 7: e29976
- Suarez-Calvet M, Neumann M, Arzberger T, Abou-Ajram C, Funk E, et al. 2016. Monomethylated and unmethylated FUS exhibit increased binding to Transportin and distinguish FTLD-FUS from ALS-FUS. *Acta neuropathologica* 131: 587-604
- Sun S, Ling SC, Qiu J, Albuquerque CP, Zhou Y, et al. 2015. ALS-causative mutations in FUS/TLS confer gain and loss of function by altered association with SMN and U1-snRNP. *Nature communications* 6: 6171
- Suzuki N, Aoki M, Warita H, Kato M, Mizuno H, et al. 2010. FALS with FUS mutation in Japan, with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. *Journal of human genetics* 55: 252-4
- Suzuki N, Kato S, Kato M, Warita H, Mizuno H, et al. 2012. FUS/TLS-immunoreactive neuronal and glial cell inclusions increase with disease duration in familial amyotrophic lateral sclerosis with an R521C FUS/TLS mutation. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 71: 779-88
- Swinnen B, Robberecht W. 2014. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews. Neurology* 10: 661-70
- Takahama K, Takada A, Tada S, Shimizu M, Sayama K, et al. 2013. Regulation of telomere length by G-quadruplex telomere DNA- and TERRA-binding protein TLS/FUS. *Chemistry & biology* 20: 341-50
- Tan AY, Manley JL. 2010. TLS inhibits RNA polymerase III transcription. *Molecular and cellular biology* 30: 186-96
- Tan AY, Riley TR, Coady T, Bussemaker HJ, Manley JL. 2012. TLS/FUS (translocated in liposarcoma/fused in sarcoma) regulates target gene transcription via single-stranded DNA response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6030-5
- Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F, Hasegawa M. 2016. Gain-of-function profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. *Human molecular genetics* 25: 1420-33
- Tang H, Macpherson P, Marvin M, Meadows E, Klein WH, et al. 2009. A histone deacetylase 4/myogenin positive feedback loop coordinates denervation-dependent gene induction and suppression. *Molecular biology of the cell* 20: 1120-31
- Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T. 2009. Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Human molecular genetics* 18: 942-55
- Taylor JP, Brown RH, Jr., Cleveland DW. 2016. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 539: 197-206

- Taylor P, Radic Z. 1994. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual review of pharmacology and toxicology* 34: 281-320
- Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A, Stallcup MR. 2005. Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 α by arginine methylation. *Genes & development* 19: 1466-73
- Tortora GJ, Grabowski SR. 1994. *Principes d'anatomie et de physiologie*.
- Towne C, Raoul C, Schneider BL, Aebischer P. 2008. Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16: 1018-25
- Tradewell ML, Yu Z, Tibshirani M, Boulanger MC, Durham HD, Richard S. 2012. Arginine methylation by PRMT1 regulates nuclear-cytoplasmic localization and toxicity of FUS/TLS harbouring ALS-linked mutations. *Human molecular genetics* 21: 136-49
- Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman OM. 2000. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. *Archives of neurology* 57: 1171-6
- Tsuda H, Han SM, Yang Y, Tong C, Lin YQ, et al. 2008. The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein VAPB is cleaved, secreted, and acts as a ligand for Eph receptors. *Cell* 133: 963-77
- Tudor EL, Galtrey CM, Perikinton MS, Lau KF, De Vos KJ, et al. 2010. Amyotrophic lateral sclerosis mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein-B transgenic mice develop TAR-DNA-binding protein-43 pathology. *Neuroscience* 167: 774-85
- Turner BJ, Ackerley S, Davies KE, 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: 815-24
- Turner MR, Goldacre R, Ramagopalan S, Talbot K, Goldacre MJ. 2013. Autoimmune disease preceding amyotrophic lateral sclerosis: an epidemiologic study. *Neurology* 81: 1222-5
- Turner MR, Parton MJ, Leigh PN. 2001. Clinical trials in ALS: an overview. *Seminars in neurology* 21: 167-75
- Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, et al. 2015. FUS regulates AMPA receptor function and FTLD/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nature communications* 6: 7098
- Uranishi H, Tetsuka T, Yamashita M, Asamitsu K, Shimizu M, et al. 2001. Involvement of the pro-oncoprotein TLS (translocated in liposarcoma) in nuclear factor-kappa B p65-mediated transcription as a coactivator. *The Journal of biological chemistry* 276: 13395-401
- Urbani A, Belluzzi O. 2000. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *The European journal of neuroscience* 12: 3567-74
- Urushitani M, Kurisu J, Tsukita K, Takahashi R. 2002. Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* 83: 1030-42
- Ustanina S, Carvajal J, Rigby P, Braun T. 2007. The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem cells* 25: 2006-16
- Valdez G, Heyer MP, Feng G, Sanes JR. 2014. The role of muscle microRNAs in repairing the neuromuscular junction. *PLoS one* 9: e93140

- van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, et al. 2017. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 390: 2084-98
- Van Hoecke A, Schoonaert L, Lemmens R, Timmers M, Staats KA, et al. 2012. EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. *Nature medicine* 18: 1418-22
- van Rheenen W, Shatunov A, Dekker AM, McLaughlin RL, Diekstra FP, et al. 2016. Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics* 48: 1043-8
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, et al. 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323: 1208-11
- Vance C, Scotter EL, Nishimura AL, Troakes C, Mitchell JC, et al. 2013. ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. *Human molecular genetics* 22: 2676-88
- Vande Velde C, McDonald KK, Boukhedimi Y, McAlonis-Downes M, Lobsiger CS, et al. 2011. Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. *PLoS one* 6: e22031
- Vercruyse P, Sinniger J, El Oussini H, Scekcic-Zahirovic J, Dieterle S, et al. 2016. Alterations in the hypothalamic melanocortin pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 139: 1106-22
- Vercruyse P, Vieau D, Blum D, Petersen A, Dupuis L. 2018. Hypothalamic Alterations in Neurodegenerative Diseases and Their Relation to Abnormal Energy Metabolism. *Frontiers in molecular neuroscience* 11: 2
- Vucic S, Kiernan MC. 2006. Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 117: 1458-66
- Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC. 2007. Fatigue and activity dependent changes in axonal excitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 78: 1202-8
- Waibel S, Neumann M, Rosenbohm A, Birve A, Volk AE, et al. 2013. Truncating mutations in FUS/TLS give rise to a more aggressive ALS-phenotype than missense mutations: a clinico-genetic study in Germany. *European journal of neurology* 20: 540-6
- Waibel S, Reuter A, Malessa S, Blaugrund E, Ludolph AC. 2004. Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. *Journal of neurology* 251: 1080-4
- Wallace TL, Bertrand D. 2013. Importance of the nicotinic acetylcholine receptor system in the prefrontal cortex. *Biochemical pharmacology* 85: 1713-20
- Wang FC, Gerard P, Bouquiaux O. 2004. [Advantages and limitations of the motor unit number estimation techniques]. *Revue medicale de Liege* 59 Suppl 1: 38-48
- Wang J, Zhang HY, Tang XC. 2009. Cholinergic deficiency involved in vascular dementia: possible mechanism and strategy of treatment. *Acta pharmacologica Sinica* 30: 879-88
- Wang L, Gutmann DH, Roos RP. 2011. Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Human molecular genetics* 20: 286-93

- Wang W, Wang L, Lu J, Siedlak SL, Fujioka H, et al. 2016. The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nature medicine* 22: 869-78
- Wang WY, Pan L, Su SC, Quinn EJ, Sasaki M, et al. 2013. Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nature neuroscience* 16: 1383-91
- Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, et al. 2008. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 454: 126-30
- Wang X, Fan H, Ying Z, Li B, Wang H, Wang G. 2010. Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neuroscience letters* 469: 112-6
- Watts GD, Thomasova D, Ramdeen SK, Fulchiero EC, Mehta SG, et al. 2007. Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Clinical genetics* 72: 420-6
- Wijesekera LC, Leigh PN. 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet journal of rare diseases* 4: 3
- Williamson TL, Cleveland DW. 1999. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nature neuroscience* 2: 50-6
- Wills AM, Hubbard J, Macklin EA, Glass J, Tandan R, et al. 2014. Hypercaloric enteral nutrition in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet* 383: 2065-72
- Wong M, Martin LJ. 2010. Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Human molecular genetics* 19: 2284-302
- Wood SJ, Slater CR. 2001. Safety factor at the neuromuscular junction. *Progress in neurobiology* 64: 393-429
- Worms PM. 2001. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *Journal of the neurological sciences* 191: 3-9
- Wozniak AC, Anderson JE. 2007. Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236: 240-50
- Writing G, Edaravone ALSSG. 2017. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Neurology* 16: 505-12
- Wu CH, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, et al. 2012. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 488: 499-503
- Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, et al. 2001. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *The EMBO journal* 20: 6414-23
- Xia CH, Roberts EA, Her LS, Liu X, Williams DS, et al. 2003. Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *The Journal of cell biology* 161: 55-66
- Xia R, Liu Y, Yang L, Gal J, Zhu H, Jia J. 2012. Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a Drosophila model of Fus-mediated ALS. *Molecular neurodegeneration* 7: 10
- Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, et al. 2008. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease

- in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 7594-9
- Yamashita S, Kimura E, Tawara N, Sakaguchi H, Nakama T, et al. 2013. Optineurin is potentially associated with TDP-43 and involved in the pathogenesis of inclusion body myositis. *Neuropathology and applied neurobiology* 39: 406-16
- Yamazaki T, Chen S, Yu Y, Yan B, Haertlein TC, et al. 2012. FUS-SMN protein interactions link the motor neuron diseases ALS and SMA. *Cell reports* 2: 799-806
- Yasojima K, Tourtellotte WW, McGeer EG, McGeer PL. 2001. Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy. *Neurology* 57: 952-6
- Yasuda K, Zhang H, Loisel D, Haystead T, Macara IG, Mili S. 2013. The RNA-binding protein Fus directs translation of localized mRNAs in APC-RNP granules. *The Journal of cell biology* 203: 737-46
- Ying H, Yue BY. 2016. Optineurin: The autophagy connection. *Experimental eye research* 144: 73-80
- Yogev O, Williams VC, Hinitz Y, Hughes SM. 2013. eIF4EBP3L acts as a gatekeeper of TORC1 in activity-dependent muscle growth by specifically regulating Mef2ca translational initiation. *PLoS biology* 11: e1001679
- Yoshimoto K, Irizawa Y, Komura S. 1993. Rapid postmortem changes of rat striatum dopamine, serotonin, and their metabolites as monitored by brain microdialysis. *Forensic science international* 60: 183-8
- Yu Z, Dadgar N, Albertelli M, Gruis K, Jordan C, et al. 2006. Androgen-dependent pathology demonstrates myopathic contribution to the Kennedy disease phenotype in a mouse knock-in model. *The Journal of clinical investigation* 116: 2663-72
- Zagoraoui L, Akay T, Martin JF, Brownstone RM, Jessell TM, Miles GB. 2009. A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron* 64: 645-62
- Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, et al. 2006. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of cell science* 119: 1824-32
- Zang DW, Cheema SS. 2002. Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1(G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters* 332: 99-102
- Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, et al. 2015. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surgical neurology international* 6: 171
- Zhang B, Liang C, Bates R, Yin Y, Xiong WC, Mei L. 2012. Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *Molecular brain* 5: 7
- Zhang B, Tu P, Abtahian F, Trojanowski JQ, Lee VM. 1997. Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *The Journal of cell biology* 139: 1307-15
- Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, Grima JC, Machamer JB, et al. 2015. The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* 525: 56-61
- Zhou Y, Liu S, Liu G, Ozturk A, Hicks GG. 2013. ALS-associated FUS mutations result in compromised FUS alternative splicing and autoregulation. *PLoS genetics* 9: e1003895
- Zinszner H, Sok J, Immanuel D, Yin Y, Ron D. 1997. TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. *Journal of cell science* 110 (Pt 15): 1741-50

Rôle du muscle squelettique dans la Sclérose Latérale Amyotrophique : apport de modèles transgéniques conditionnels

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative dont les premiers symptômes apparaissent généralement vers 60 ans. Elle affecte sélectivement le système moteur et provoque une paralysie progressive amenant au décès du patient par défaillance respiratoire en quelques années. À ce jour, il n'existe aucun traitement curatif, d'où la nécessité de comprendre la physiopathologie de la SLA. Bien que de nombreuses altérations dans le muscle aient été mises en évidence, sa contribution dans la SLA reste à définir.

Nous avons montré que FUS est enrichi dans les noyaux sous-synaptiques de façon dépendante de l'innervation. De plus, FUS se lie au promoteur des récepteurs de l'acétylcholine et induit leur transcription de façon dépendante d'ERM. Le mutant FUS, quant à lui, est enrichi dans les noyaux extra-synaptiques et entraîne une toxicité musculaire responsable de l'altération de la jonction neuromusculaire (JNM). Au-delà de la JNM, FUS active MEF2A, de façon dépendante de PRMT1 afin de réguler les fonctions mitochondriales et la différenciation musculaire. La toxicité musculaire de FUS joue donc un rôle clé dans la physiopathologie de la SLA.

Mots clés : Sclérose Latérale Amyotrophique, FUS, Jonction neuromusculaire, Muscle, Récepteurs de l'acétylcholine

Amyotrophic lateral sclerosis is a neurodegenerative whose first symptoms generally appear around age 60. It is characterized by progressive motor neuron degeneration, paralysis and leading to death due to respiratory failure in a few years. Currently, there is no cure so the understanding of ALS physiopathology is necessary. Although many alterations in the muscle have been highlighted, its contribution in ALS remains to be defined.

We showed that FUS is enriched in subsynaptic nuclei and this enrichment depended on innervation. Besides, FUS binds directly acetylcholine receptors (AChR) promoter and is required for Erm-dependent induction of AChR expression. Conversely, mutant FUS is enriched on extra-synaptic nuclei and induce muscle intrinsic toxicity responsible for neuromuscular junction (NMJ) alteration. Beyond NMJ, FUS is required for muscle mitochondrial function and muscle differentiation through PRMT1-dependent MEF2A activation. Thus, FUS muscular toxicity plays a key role in the ALS physiopathology.

Key words: Amyotrophic lateral sclerosis, FUS, neuromuscular junction, muscle, acetylcholine receptors