



**HAL**  
open science

# Etude du continuum mécanistique et physiopathologique entre la Sclérose Latérale Amyotrophique et la Démence FrontoTemporale

Robin Waegaert

► **To cite this version:**

Robin Waegaert. Etude du continuum mécanistique et physiopathologique entre la Sclérose Latérale Amyotrophique et la Démence FrontoTemporale. Neurosciences. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ110 . tel-02918571

**HAL Id: tel-02918571**

**<https://theses.hal.science/tel-02918571>**

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**

**U1118 INSERM**

**THÈSE** présentée par :

**Waegaert Robin**

Soutenue le : **10 avril 2019**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Etude du continuum mécanistique et  
physiopathologique entre la Sclérose  
Latérale Amyotrophique et la  
Démence FrontoTemporale**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme RENE Frédérique**

Maitre de conférences universitaire,  
Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme BUTLER-BROWNE Gillian**

Directrice de recherche, Université de Paris

**Mme BLASCO Hélène**

Professeure des universités-Praticienne-hospitalière,  
Université de Tours

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mr GASMAN Stéphane**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

**Mr CHARLET-BERGUERAND Nicolas**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

**Mr ECHANIZ-LAGUNA Andoni**

Professeur des universités-Praticien hospitalier,  
Université Paris-sud

---

*C'est une erreur capitale que de bâtir des théories tant qu'on n'a pas de données. Insensiblement, on se met à torturer les faits pour les faire cadrer avec les théories, au lieu d'adapter les théories aux faits.*

*Arthur Conan Doyle*

# Remerciements

Après ces 3 années et des poussières de thèse, je me dois de remercier un certain nombre de personnes grâce auxquelles je suis parvenu à survivre.

Premièrement, je tiens à remercier Frédérique René, ma directrice de thèse. Déjà pour m'avoir accepté en doctorat mais surtout pour m'avoir permis d'acquérir davantage de rigueur scientifique aussi bien expérimentalement que dans la rédaction de ce pavé qui représente 3 années de dur labeur. Merci pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordé.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse, Gillian Butler-Browne, Hélène Blasco, Stéphane Gasman, Nicolas Charlet-Berguerand et Andoni Echaniz-Laguna pour avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Un grand merci aux docteurs Jean-Philippe Loeffler, Caroline Rouaux, Luc Dupuis et Jose Luiz Gonzalez De Aguilar pour les échanges scientifiques (et autres) qui m'ont aidé et aiguillé tout au long de ma thèse.

Merci Sylvie pour le temps que tu as consacré à mon projet, en particulier durant les 6 derniers mois. Ton soutien et tes conseils m'ont permis de mener à bien mes projets. Enfin, « j'dis ça, j'dis rien ».

Impossible d'oublier le travail accompli par mon jeune padawan, Florian Parisot que j'ai eu la chance d'encadrer durant son BTS et son apprentissage. Ton travail rigoureux, ta bonne humeur et ta sympathie sont autant de qualités qui m'ont rapidement fait oublier ta ponctualité chancelante. Merci à ton canapé pour m'avoir accueilli et soutenu pendant nos soirées prolongées.

Thibeauld Burg, mon collègue de master, mon âme-sœur, ma bouée de sauvetage dans cette marée de paillements féminins, merci pour ces trois superbes années passées avec toi. Difficile d'oublier nos séjours sur VDR ou ITA, ta défaite cuisante au caps ou ta dansante (troublante) à la Sala.

Gina, à l'inverse de toi, je vais essayer d'être bref. Merci pour ta folie naturelle, ta bonne humeur, ton absence de talent en cuisine ou tes coups de gueules que j'ai pu apprécier tout au long de nos thèses respectives et qui m'ont fait mourir de rire. Lorraine Forever !

Merci également à mon fournisseur officiel d'épisodes de Game of Thrones, Stéphane, le « Dieu de la qPCR ». Merci d'avoir supporté en silence (enfin pas toujours), tous mes tocs, que ce soit mes hochements de jambes ou mes raclements de gorges ô combien insupportables. Tes petits « hum-hum » vont me manquer ^^.

Gracias también a Imma, el Chipiron!! Tu m'as permis de découvrir tout un pan de la culture espagnole que je ne connaissais pas comme les sombreros ou les fajitas ^^ . J'ai apprécié d'avoir une collègue aussi Gorda que moi. BANANA TIME !

Merci à Alexandra aka Bouskigniak pour son impulsivité (pour ne pas dire agressivité ^^) et toutes les discussions qu'on a pu avoir dans le labo. Si je devais ne garder qu'un seul souvenir, il se résumerait à un mot : Nagui.

Un grand merci à Raphaëlle, Yip-woman, la boule d'énergie zen, toujours de bons conseils que ce soit d'un point de vue scientifique ou non. Merci pour la relecture de mes deux manuscrits ;) et merci d'avoir été le petit Larousse sur mon épaule.

Je tiens également à remercier Marco, le Marvel-Addict pour sa bonne humeur et son bon gout (pas toujours hein) pour les films et série. C'est agréable de voir un peu de brutalité dans ce monde de tact et de douceur.



Merci à la relève, Aurore et Cyril. Aurore, tu m'as appris que les vegans pouvaient être des gens (à peu près) biens. J'espère que tu recevras un jour ta lettre pour Poudlard ^^ . Cyril, alias Freddy, petite mandarine du Bengladesh, merci pour tout le bon son que tu m'as servi pendant ces quelques mois (#sexypourtoi).

Danke schon au Fischerman, pour toutes tes connaissances en informatique mais aussi ta gentillesse, ta disponibilité et les courses en trottinette jusqu'à la gare. Toujours un plaisir de discuter avec toi !

Merci à Hajer et Jelena, les deux morfales du labo, toujours partantes pour un burger ! Jelena, heureusement que tu étais là pour remonter le niveau de la culture cinématographique.

Merci également à ceux partis trop tôt, Alex pour ton bon gout en matière de musique mais aussi Christine pour toutes tes attentions comme les messages drôles (enfin pas toujours) que tu collais sur nos bureaux.

Lors d'une thèse, le soutien ne se résume pas à l'apport scientifique de chacun, c'est pourquoi je tiens également à remercier ceux qui ont participé à la survie de ma vie sociale.

Merci à toute la clique de Meuse, Mazel, Touss Touss, Roma, Jerem, Max, Romanus, Axel et Grand Touss. Merci pour toutes les soirées, tous les voisins réveillés et tous les caps. Un merci particulier à La Voute (TOUCAN !) pour tout cela et plus encore, toutes les soirées Super Smash/Mario Kart/JDR mais aussi à Culot alias Hans Gruber, Voltaire, Corry, etc pour tous les fous rires. T'es vraiment un mec que j'apprécie (Illusion 100) !

Merci aussi à la Patate anglaise pour son soutien d'outre-Manche. Compagnons de galère à distance ! Hâte que tu nous reviennes !

Merci également à toute ma famille, que ce soit les cousins, les cousines ou les plus vieux pour tous ces moments inoubliables (bien souvent autour d'un verre ^^) et pour tous ceux à venir (qui se feront probablement autour d'un verre).

Merci à mes parents pour leur soutien et tous leurs « alors ça avance ta thèse ? » Merci de n'avoir jamais douté de votre enfant le plus doué. Merci à ma sœur pour sa prévoyance, ses conseils, son humour et sa maison dans le sud.

Enfin, the last but not least, merci à Cécile, ma conjointe. Difficile d'être concis tant tu joues une part importante dans la finalité de mon travail. Tu mériterais une place dans mes publications, mais bon dommage que je ne partage pas...

# Table des matières

<i>Avant-propos</i> .....	<i>1</i>
<i>Introduction</i> .....	<i>4</i>
<b>I. Le syndrome SLA-DFT</b> .....	<b>4</b>
1. Aspects Cliniques .....	4
A. La Sclérose Latérale Amyotrophique.....	4
a. Historique.....	4
b. Epidémiologie .....	4
c. Tableau clinique.....	6
d. Diagnostic .....	10
e. Pronostic et évaluation de la progression de la maladie.....	13
f. Thérapies.....	15
B. La Démence FrontoTemporale.....	17
a. Historique.....	17
b. Epidémiologie .....	17
c. Tableau clinique.....	18
d. Diagnostic .....	19
e. Thérapies.....	23
2. Origines génétiques de la SLA et de la DFT .....	24
A. Gènes spécifiques à la SLA.....	26
B. Gènes spécifiques à la DFT .....	28
C. Gènes du continuum SLA-DFT.....	30
D. Les autres gènes.....	34
3. Physiopathologie du syndrome SLA-DFT .....	36
A. La neuroinflammation .....	36
B. L'homéostasie protéique .....	38
a. Stress du réticulum endoplasmique.....	38

b.	Inclusions protéiques.....	38
c.	Syndrome SLA-DFT : maladie de type prion ?.....	39
<b>II.</b>	<b>Le processus autophagique dans le syndrome SLA-DFT.....</b>	<b>40</b>
1.	Le processus autophagique.....	40
A.	Le lysosome.....	40
B.	Les différentes formes d'autophagie .....	43
a.	La microautophagie.....	43
b.	L'autophagie médiée par les chaperones.....	44
c.	La macroautophagie .....	44
d.	Macroautophagie sélective et non sélective. ....	47
e.	Autophagie et endocytose .....	50
C.	Les régulateurs de l'autophagie.....	50
a.	Régulateurs endogènes.....	50
b.	Régulateurs pharmacologiques.....	52
2.	Autophagie et syndrome SLA-DFT.....	55
A.	Modulateurs directs .....	55
B.	Modulateurs indirects.....	56
<b>III.</b>	<b>Le gène <i>CHMP2B</i>.....</b>	<b>59</b>
1.	Structure de CHMPB.....	59
2.	Fonction de CHMP2B .....	59
A.	CHMP2B et complexes ESCRT.....	59
B.	Les complexes ESCRT dans l'endocytose .....	61
C.	Complexes ESCRT et bourgeonnement viral.....	62
D.	Complexes ESCRT et cytocinèse .....	63
E.	Complexes ESCRT et formation et stabilisation des épines dendritiques.....	63
3.	Le gène <i>CHMP2B</i> dans la SLA et la DFT.....	64
A.	Découverte dans la SLA et la DFT.....	64
B.	Mutations connues.....	65

C. Mécanismes pathologiques en lien avec le mutant <i>CHMP2B<sup>intron5</sup></i> et modèles animaux développés .....	66
a. Données <i>in vitro</i> .....	66
b. Modèles animaux .....	67
<b><i>Problématique de thèse</i></b> .....	<b>70</b>
<b><i>Résultats</i></b> .....	<b>73</b>
I. Publication 1 : Analyse transcriptomique longitudinale des processus altérés dans un modèle de SLA et de DFT : des altérations du métabolisme lipidique et du système immunitaire à des perturbations de l'activité neuronale (soumise).....	73
II. Publication 2 : Le mutant <i>CHMP2B<sup>intron5</sup></i> entraîne une altération fonctionnelle du lysosome et une répression de l'autophagie (en préparation).....	116
III. Publication 3 : Dysfonctionnement de la jonction neuromusculaire et modification du métabolisme musculaire en réponse à l'expression neuronale du mutant <i>CHMP2B<sup>intron5</sup></i> (en préparation).....	149
<b><i>Discussion</i></b> .....	<b>175</b>
I. <i>CHMP2B<sup>intron5</sup></i> : gain ou perte de fonction ?.....	175
II. Mécanismes pathologiques associés au gain de fonction de <i>CHMP2B<sup>intron5</sup></i> .....	177
1. Agrégation de <i>CHMP2B<sup>intron5</sup></i> .....	177
2. <i>CHMP2B<sup>intron5</sup></i> et maladies de stockage lysosomale .....	177
3. RAB7 et trafic endolysosomale.....	179
4. <i>TMEM106B</i> , facteur de risque de la DFT.....	180
5. Le lysosome au-delà de la dégradation protéique.....	182
III. <i>CHMP2B<sup>intron5</sup></i> : vers un modèle plus humain.....	183
IV. L'autophagie : acteur central du syndrome SLA-DFT .....	186
1. Autophagie et stress du RE.....	186
2. Autophagie et stress oxydatif .....	186
3. Autophagie et hypoxie.....	186
4. Autophagie et réparation de l'ADN.....	186
5. Autophagie et apoptose .....	188

<b><i>Conclusion</i></b> .....	<b>191</b>
<b><i>Bibliographie</i></b> .....	<b>193</b>
<b><i>Annexes</i></b> .....	<b>232</b>
I. Données supplémentaires de la publication 1 .....	<b>232</b>
II. Caractérisation du modèle murin CHMP2B <sup>intron5</sup> .....	<b>266</b>

# Table des illustrations

Figure 1 : Les trois formes de SLA

Figure 2 : Dégénérescence des neurones moteurs corticaux et motoneurones dans la SLA

Figure 3 : Continuum clinique entre la SLA et la DFT

Figure 4 : Tableau de l'ALSFRS-R

Figure 5 : Evolution de l'atteinte de la substance grise dans différentes formes de DFT

Figure 6 : Gènes de la SLA découverts et fonctions associées

Figure 7 : Formes familiales et sporadiques dans la SLA et la DFT

Figure 8 : Mécanismes hypothétiques associés au mutant *C9ORF72*

Figure 9 : Génétique de la SLA

Figure 10 : Génétique de la DFT

Figure 11 : Composante histopathologique du syndrome SLA-DFT

Figure 12 : Transport « M6P dépendant » des hydrolases acides vers le lysosome

Figure 13 : Les différentes formes d'autophagie dans la cellule eucaryote

Figure 14 : Mécanismes de la macroautophagie

Figure 15 : Régulation endogène ou pharmacologique de la macroautophagie

Figure 16 : Impact des différents mutants liés à la SLA et/ou la DFT sur le processus autophagique

Figure 17 : Structure de la protéine CHMP2B

Figure 18 : Protéines des complexes ESCRT et leurs interactions

Figure 19 : Rôle des complexes ESCRT dans l'endocytose

Figure 20 : Rôle des complexes ESCRT dans les phénomènes de scission membranaire

Figure 21 : Séquence poly-peptidique de CHMP2B chez différentes espèces et ses principaux mutants

Figure 22 : Mutations du gène *CHMP2B* en lien avec des maladies neurodégénératives

Figure 23 : Caractéristiques des souris transgéniques du modèle *CHMP2B*<sup>intron5</sup>

Figure 24 : Impact du mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> sur le processus autophagique

Figure 25 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des différents modèles animaux *CHMP2B*<sup>intron5</sup>

Figure 26 : Rôle de l'autophagie dans l'homéostasie cellulaire

## Abréviations :

ALSFRS-R: Amyotrophic Lateral Sclerosis functional rating scale- revisited

AMC: autophagie médiée par les chaperonnes

AMP: atrophie musculaire progressive

ATG: autophagy related gene

CHMP2B: charged multivesicular body protein 2b

DFT: Démence FrontoTemporale

ERO: espèce réactive de l'oxygène

ESCRT: endosomal sorting complexes required for transport

FDA: food and drug administration

HE: hétérozygote

HO: homozygote

iPS : induced pluripotent stem

IRM: imagerie par résonance magnétique

JNM: jonction neuromusculaire

LC3/MAP1LC3: microtubule associated protein 1 light chain 3

M6P: mannose-6-phosphate

M6PR: mannose-6-phosphate receptor

LCR: liquide céphalorachidien

RE: réticulum endoplasmique

SLA: Sclérose Latérale Amyotrophique

SNC: système nerveux central

SOD1: superoxyde dismutase 1

UBI: ubiquitine

UPR: unfolded protein response

UPS: ubiquitin-proteasome system

VPS: vacuolar protein sorting

## Avant-propos

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est la maladie du motoneurone la plus répandue chez l'adulte. Elle se caractérise par une dégénérescence des neurones moteurs corticaux situés au niveau du cortex moteur et des motoneurons situés au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière. La dégénérescence de ces populations neuronales entraîne la paralysie progressive du patient puis sa mort dans les 2 à 5 années suivant le diagnostic.

La Démence FrontoTemporale (DFT) est la forme de démence la plus répandue après la maladie d'Alzheimer. Les patients présentent une atrophie des lobes frontaux et temporaux du cortex cérébral, entraînant des troubles sociaux, émotionnels et linguistiques importants.

Il y a plusieurs années, la communauté scientifique a établi la notion de continuum entre ces deux pathologies de par le recoupement des tableaux cliniques présentés par les patients. A l'heure actuelle, environ 15% des patients atteints de SLA développent par la suite des symptômes associés à la DFT et inversement. Cette notion de continuum clinique est appuyée par des arguments génétiques. En effet, un grand nombre de gènes ont été au cours des années mis en évidence comme participant au développement de ces deux pathologies. Le premier d'entre eux était *CHMP2B*, découvert en 2006. Aujourd'hui, on appelle syndrome SLA-DFT, l'ensemble des caractéristiques cliniques, génétiques ou histologiques communes à la SLA et à la DFT.

Si ces deux maladies, en particulier la SLA, sont très étudiées de par la fatalité de leur diagnostic, très peu de modèles animaux récapitulant à la fois les caractéristiques cliniques de la SLA et de la DFT ont été générés, en dépit du nombre de patients atteint par ce syndrome. De surcroît, très peu d'études portent sur le gène *CHMP2B*, pourtant premier gène identifié dans ce syndrome SLA-DFT.

Afin de comprendre les mécanismes pathologiques mis en place chez les patients SLA-DFT porteurs d'une mutation au niveau de ce gène, nous avons développé et caractérisé au sein du laboratoire un nouveau modèle murin dans lequel les souris transgéniques présentent des caractéristiques phénotypiques, histologiques et biochimiques liées à ces deux maladies.

L'objectif de ma thèse a été de déterminer l'impact de l'expression neuronale du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* dans ce modèle murin afin de comprendre plus en détail les mécanismes mis en place précocement et tardivement chez les patients porteurs de cette mutation.

La première partie de mon introduction portera sur la SLA et la DFT, de leurs aspects cliniques à la notion de continuum les reliant puis décrira le processus autophagique et son lien avec la SLA et la DFT. Enfin, je présenterai le rôle de *CHMP2B* dans la cellule et dans ce syndrome.

Les résultats que j'ai obtenus au cours de mon doctorat seront présentés sous la forme de trois articles scientifiques portant respectivement sur l'analyse des dérégulations transcriptomiques au niveau de la



moelle épinière lombaire, l'étude des altérations du processus autophagique et l'étude de l'axe neuromusculaire dans un modèle murin CHMP2B<sup>intron5</sup>.

La dernière partie de mon manuscrit discutera de l'impact du mutant CHMP2B<sup>intron5</sup>, de ses mécanismes pathologiques conduisant à la neurodégénérescence ainsi que du rôle central de l'autophagie dans la SLA et la DFT.

# Introduction

# Introduction

## I. Le syndrome SLA-DFT

### 1. Aspects Cliniques

#### A. La Sclérose Latérale Amyotrophique

##### a. Historique

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative décrite pour la première fois par le neurologue français Jean-Martin Charcot en 1869. Le terme « sclérose » fait référence au durcissement et à la dégénérescence de la moelle épinière observés sur les tissus post-mortem des patients, « latérale » définit la zone dans laquelle la dégénérescence survient et enfin « amyotrophique » se réfère à la faiblesse et à l'atrophie musculaires retrouvées chez les patients. Cette maladie, restée méconnue après son premier diagnostic, est devenue populaire lorsque le joueur de base-ball Lou Gehrig en est mort en 1941.

Aujourd'hui, la SLA se caractérise par la dégénérescence conjointe des neurones moteurs corticaux au niveau du cortex moteur et des motoneurons bulbares et spinaux localisés respectivement au niveau du bulbe rachidien et de la moelle épinière. Elle entraîne une paralysie progressive des patients entraînant leur mort par insuffisance respiratoire dans les 2 à 5 ans suivant leur diagnostic. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif à cette pathologie.

##### b. Epidémiologie

- Incidence et prévalence

La SLA est la maladie neurodégénérative la plus répandue après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle affecte en moyenne chaque année 1 à 3 nouveaux individus pour 100.000 en Europe et en Asie et entre 1 et 2 individus pour 100.000 en Amérique (Boumediene et al., 2011, Chio et al., 2013, Talbot, 2002, Zarei et al., 2015). La prévalence de la SLA varie peu en fonction de la zone géographique, avec entre 4 et 8 individus atteints pour 100.000 en Europe et entre 2 et 3 individus atteints pour 100.000 en Amérique et en Asie avec néanmoins une prévalence plus forte au Japon (11,2/100.000). La SLA affecte légèrement plus les hommes que les femmes avec un ratio d'incidence homme/femme d'environ 1,35/1 (Abhinav et al., 2007, Chio et al., 2009b, Group, 1992, Vazquez et al., 2008).

- Facteurs de risque

Il existe un certain nombre de paramètres qui influencent différemment les probabilités de chacun de développer une SLA. Certains de ces paramètres sont dits endogènes et vont directement dépendre de la génétique. D'autres, exogènes, sont liés à l'environnement et aux conditions de vie de l'individu.

### Facteurs endogènes

Les facteurs endogènes sont principalement en lien avec des mutations ponctuelles ou héritées mais pas seulement car comme nous avons pu le voir précédemment, les hommes présentent une incidence plus forte que les femmes, soulevant l'hypothèse d'un facteur endogène en lien avec le sexe. De même, les antécédents médicaux d'un individu peuvent le prédisposer à la SLA. C'est le cas pour certaines maladies auto-immunes comme la polymyosite et l'asthme (Turner et al., 2013).

### Facteurs environnementaux

En plus de ces causes endogènes, il en existe d'autres exogènes dont l'impact, bien qu'incertain d'un individu à l'autre, semble en lien avec la SLA. Ces facteurs sont dits environnementaux.

#### Métaux lourds et pesticides :

Plusieurs études ont montré l'impact négatif de l'exposition prolongée et répétée aux métaux lourds et aux pesticides dans le développement de la SLA, notamment chez les individus exerçant un métier en lien avec les exploitations agricoles ou les élevages d'animaux (Furby et al., 2010) avec encore une fois, un effet plus marqué chez les hommes (Morahan and Pamphlett, 2006). Parmi les métaux dont l'exposition semble prédisposer à la SLA, il y a le sélénium (Vinceti et al., 2010) retrouvé en quantité importante dans le liquide céphalorachidien (LCR) de patients (Vinceti et al., 2013) mais aussi le cadmium (Bar-Sela et al., 2001) et le plomb (Kamel et al., 2005).

#### Tabagisme et consommation d'alcool :

Plusieurs études sur des cohortes européennes et américaines ont montré que le tabagisme augmente le risque de développer la SLA. En effet, il semblerait que la durée de consommation de cigarettes favorise le développement de la SLA. En revanche, concernant le nombre de cigarettes consommées quotidiennement ainsi que le temps d'abstinence, les résultats divergent en fonction des études (Gallo et al., 2009, Nelson et al., 2000). Ces données sont toutefois relatives et certains facteurs sont à prendre en considération comme l'origine géographique des patients. En effet, Pamphlett et al ont réalisé quelques années plus tard une étude similaire sur une cohorte australienne plus importante en séparant hommes et femmes. Dans cette étude, l'effet du tabac dans le développement de la SLA n'a pas pu être établi. Tout comme pour le tabagisme, les études épidémiologiques basées sur le lien entre consommation d'alcool et risque de développer la SLA sont parfois contradictoires. Néanmoins, un effet plutôt protecteur de l'alcool ressort de la globalité des études réalisées (D'Ovidio et al., 2018, de Jong et al., 2012, Huisman et al., 2015).

#### Sport :

Le lien entre le sport et le développement de la SLA n'est actuellement pas clair. Cette hypothèse émane du constat qu'un certain nombre de sportifs professionnels aient été diagnostiqués pour cette maladie malgré sa faible incidence. C'est le cas du très célèbre Lou Gehrig et du tennisman français

Jérôme Golmard, décédé en 2017. Mais cela vient également du fait qu'un grand nombre de patients SLA présentaient une importante activité sportive durant leurs études (Scarmeas et al., 2002). En dépit de ces observations, aucune étude n'est parvenue à démontrer qu'une activité sportive intense représentait un facteur exogène de la SLA (Huisman et al., 2013). Il est toutefois un sport pour lequel le lien a été fait, il s'agit du football. En effet, une étude dirigée par Gabrielle Mora en 2005 a montré un grand nombre de décès en lien avec la SLA dans une population de footballeurs italiens (8 sur 375) (Chio et al., 2005). Cette relation n'a en revanche jamais été étendue à d'autres pays ni à d'autres sports, soulevant l'hypothèse de facteurs indirectement liés au football comme le dopage ou les pesticides présents sur les pelouses (Chio et al., 2009a).

### c. Tableau clinique

- Symptômes moteurs

La SLA se présente sous 3 formes, définies en fonction du site d'apparition des symptômes moteurs (Figure 1).

La **forme spinale** représente 2 cas sur 3. Les patients présentent des fasciculations (contractions involontaire de fibres musculaires) et des crampes au niveau des membres inférieurs ou supérieurs précédant une faiblesse et une atrophie musculaires. Une spasticité se met progressivement en place et plus tard, les patients présentent des spasmes en réponse à l'activation excessive de l'arc réflexe myotatique. Cet arc réflexe correspond à la contraction spontanée d'un muscle en réponse à son étirement.

La **forme bulbaire** se caractérise par des difficultés d'expression et de déglutition ainsi qu'une faiblesse au niveau de la langue, avant le développement tardif de troubles musculaires au niveau des membres.

Enfin, la **forme respiratoire**, qui est rare et ne touche que 5% des patients, n'entraîne aucun des symptômes des deux autres formes. Ici, les patients souffrent de troubles respiratoires et d'hypoventilation nocturne à l'origine de troubles du sommeil, de maux de tête et d'irritabilité (Kiernan et al., 2011, Vucic and Kiernan, 2007, Wijesekera and Leigh, 2009).

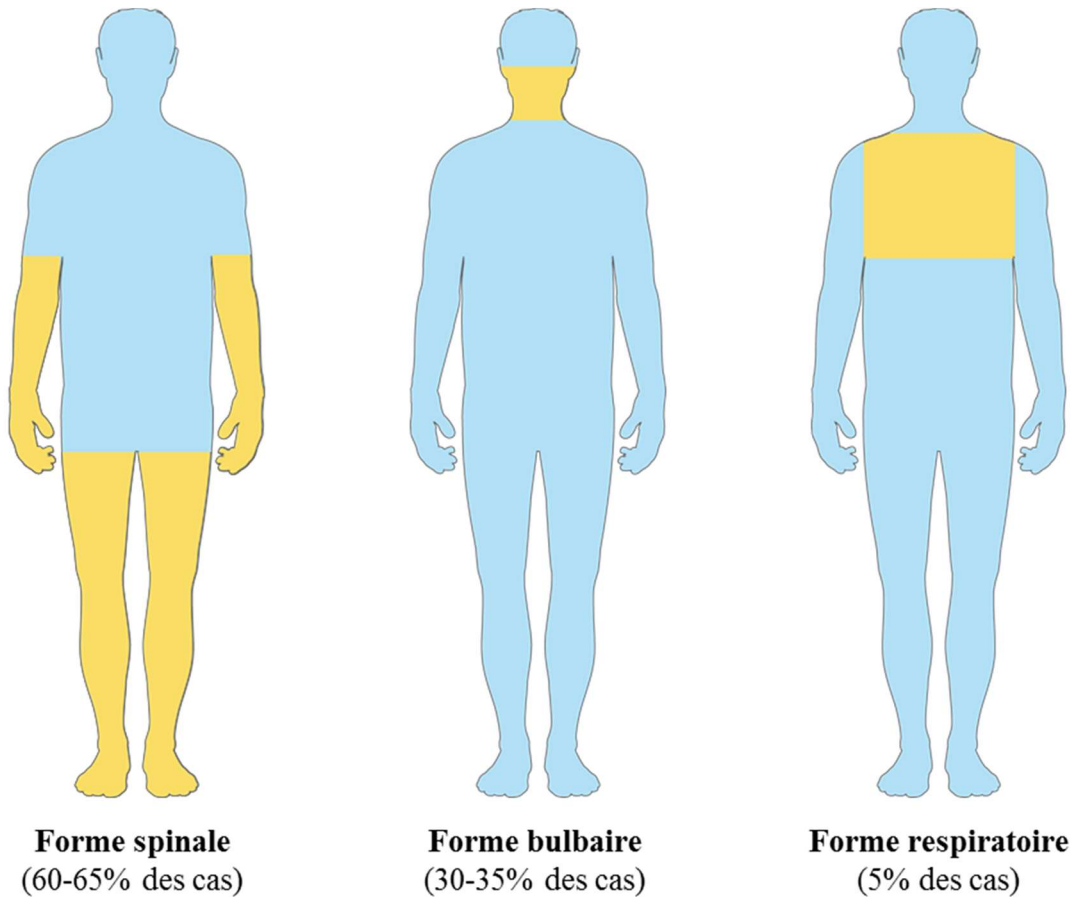


Figure 1: Les trois formes de SLA

La forme spinale, touchant 2 patients sur 3, entraîne une apparition de troubles moteurs au niveau des membres alors que la forme bulbaire (30% des cas) se caractérise par une atteinte des muscles faciaux. Dans la forme respiratoire, les patients souffrent principalement d'insuffisance respiratoire.

Ces symptômes moteurs surviennent suite à la dégénérescence des neurones moteurs corticaux situés dans le cortex moteur et des motoneurones bulbaires (dans le bulbe rachidien) et spinaux (dans la moelle épinière). D'un point de vue musculaire, les patients présentent des fasciculations ainsi que des crampes et une hypotonie qui sont la conséquence de la dégénérescence des motoneurones bulbaires et spinaux. Un phénomène de spasticité se met également en place suite à la dégénérescence des neurones moteurs corticaux (Figure 2). Ce phénomène serait lié à la perte d'une sous-population neuronale, les neurones sérotoninergiques, et retarderait l'apparition des symptômes (El Oussini et al., 2017).

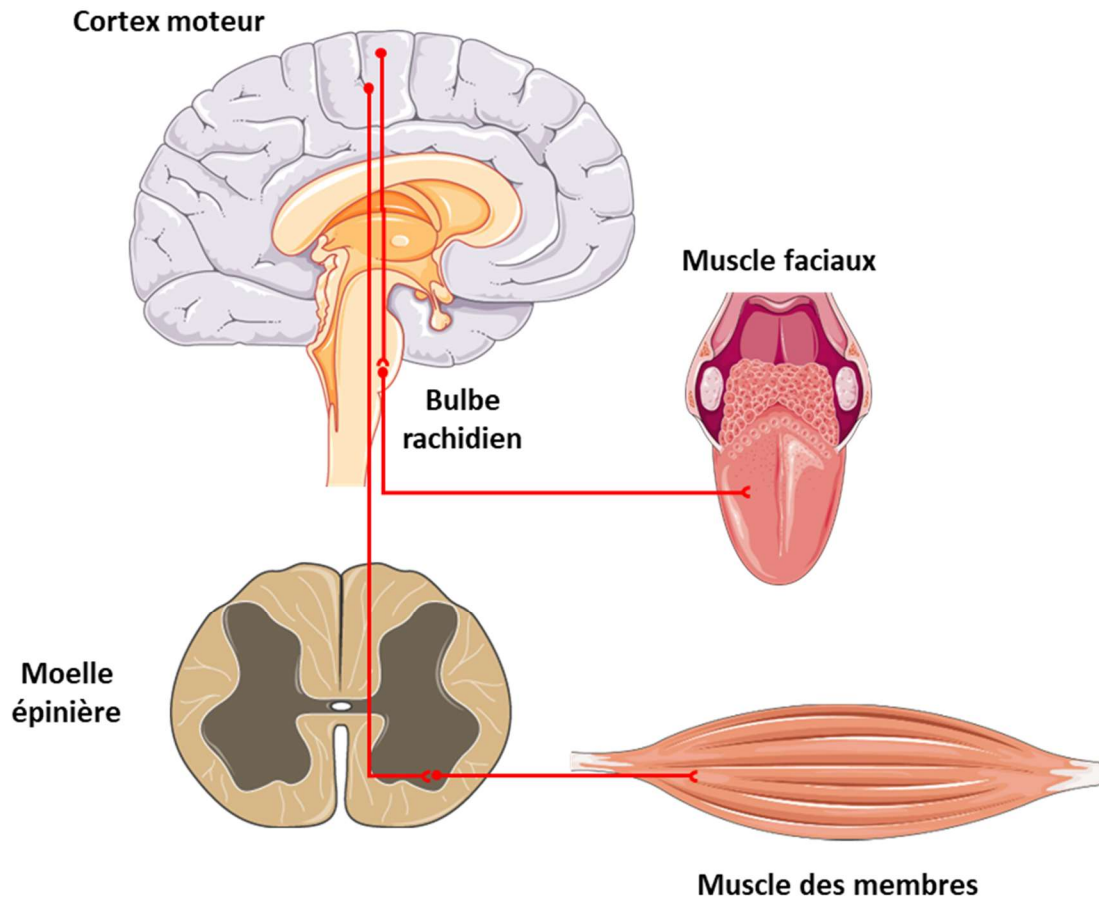


Figure 2 : Dégénérescence des neurones moteurs corticaux et motoneurones dans la SLA  
 Les neurones moteurs situés dans le cortex moteur contactent les motoneurones bulbaires et spinaux. Les motoneurones bulbaires commandent les muscles faciaux alors que les motoneurones spinaux innervent les muscles du tronc et des membres. La SLA se caractérise par la dégénérescence de ces trois types de neurones.

- Altérations métaboliques

Ces troubles moteurs s'accompagnent également d'altérations métaboliques. Environ deux tiers des patients atteints de SLA sont hypermétaboliques et présentent une dépense énergétique au repos plus importante que celle observée chez des individus sains (Desport et al., 2001, Funalot et al., 2009). Des analyses par IRM (imagerie par résonance magnétique) ont également mis en évidence une redistribution de la masse grasse chez les patients SLA, avec une augmentation de la quantité de masse grasse viscérale dont la quantité est positivement corrélée au score ALSFRS (Voir section I.1.A.e. Pronostic et évaluation de la progression de la maladie). La quantité de masse grasse sous-cutanée corrèle également positivement avec le score ALSFRS et la survie des hommes atteints de SLA (Lindauer et al., 2013). Des troubles lipidiques sont observables au niveau circulatoire avec une augmentation des quantités de cholestérol et de LDL (low-density lipoprotein). Le rapport LDL/HDL

augmente également chez les patients. Dans la même étude, il a été montré que les patients présentant une hyperlipidémie (rapport LDL/HDL au-dessus de la moyenne des patients SLA) avaient un poids, un IMC (indice de masse corporelle) et une espérance de vie supérieurs à ceux des patients présentant un rapport LDL/HDL faible, suggérant un effet protecteur de cette hyperlipidémie (Dupuis et al., 2008). Cette induction du métabolisme lipidique est associée à une augmentation de la quantité des corps cétoniques dans le sérum et le LCR des patients (Blasco et al., 2010, Kumar et al., 2010). Ces corps cétoniques sont formés au niveau du foie à partir d'acétyl-coenzyme A et peuvent servir de source d'énergie. Le métabolisme des carbohydrates est également impacté puisque les patients SLA présentent une insulino-résistance (quantités de glucose et d'insuline circulants plus importantes) (Figure 3) (Pradat et al., 2010).

L'ensemble de ces données semblent indiquer que les patients SLA présentent une répression du métabolisme glucidique, entraînant une induction compensatoire du métabolisme lipidique afin de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement des cellules. Cela expliquerait la survie plus longue des patients SLA présentant une hyperlipidémie.

- SLA et troubles comportementaux

Associés à ces symptômes moteurs qui sont indispensables au diagnostic des patients, de plus en plus d'études montrent que certains patients atteints de SLA développent également des troubles comportementaux en lien avec des formes de démences notamment la DFT (Figure 3) (Flaherty-Craig et al., 2006, Grossman et al., 2007, Strong et al., 1999). Ces altérations comportementales se retrouvent plus fréquemment dans les formes bulbaires (associées aux troubles du langage) (Bak and Hodges, 2004).



Figure 3 : Continuum clinique entre la SLA et la DFT

Certaines altérations métaboliques sont retrouvées chez les patients atteints de SLA, de DFT ou de SLA-DFT comme une insulino-résistance. IMC= indice de masse corporelle ; TC= troubles comportementaux. Image adaptée de (Ahmed et al., 2016).



#### d. Diagnostic

- « El Escorial World Federation of Neurology » et « Critères Awaji »

Le diagnostic est un véritable problème dans cette maladie. Son établissement nécessite un temps très long (entre 10 et 18 mois) en comparaison de la survie moyenne des patients qui est estimée entre 2 et 5 ans après diagnostic. Ce délai tient en grande partie à l'hétérogénéité importante des symptômes liés à la SLA. De plus, certains symptômes de la SLA sont communs à d'autres maladies appelées « ALS mimic syndrome » comme la maladie de Kennedy qui affecte uniquement le muscle et le motoneurone principalement chez les hommes (maladie récessive liée au chromosome X) (Traynor et al., 2000).

Cependant, en 1994 « El Escorial World Federation of Neurology » a posé les bases des critères au nombre de 3, établissant une SLA chez un patient. Tout d'abord, le patient doit présenter des signes de dégénérescence des motoneurons associés à une dégénérescence des neurones moteurs corticaux ainsi qu'une propagation progressive des symptômes dans une région du corps, le tout en absence de signes électrophysiologiques ou de neuro-imagerie d'une autre pathologie neurodégénérative. En fonction du tableau clinique que les patients présentent, on peut parler de :

-**SLA possible**, lorsque les signes cliniques de dysfonction au niveau des neurones moteurs corticaux ou des motoneurons sont localisés dans une seule région ou quand les signes dysfonctionnels en lien avec les neurones moteurs corticaux sont retrouvés dans plusieurs régions.

-**SLA probable**, lorsque les symptômes en lien avec ces deux populations neuronales sont mis en évidence dans au moins deux régions.

-**SLA établie**, si les symptômes en lien avec ces deux populations neuronales sont retrouvés dans au moins deux régions spinales et une région bulbaire ou trois régions spinales.

En 2008, une réévaluation de ces critères a été opérée portant le nom de « Critères Awaji ». Cette révision visait à diagnostiquer de manière plus précoce les patients. Par la suite, plusieurs études basées sur ces deux méthodes ont démontré de meilleures sensibilité (faux positif) et spécificité (faux négatif) des critères Awaji dans le diagnostic des individus atteints ou non de la SLA. Les critères établis puis revisités peuvent être mis en lumière par différentes approches décrites ci-dessous. (Brooks et al., 2000, Costa et al., 2012, de Carvalho et al., 2008, Geevasinga et al., 2016, Miller et al., 1999).

- Examens cliniques

##### L'électromyographie (EMG)

Ce test consiste à étudier l'activité électrique spontanée du muscle. Il permet de mettre en évidence un dysfonctionnement des motoneurons dans une région symptomatique ou non. Les résultats EMG d'un patient SLA montreront des fibrillations (contractions spontanées et anarchiques des fibres musculaires) et des fasciculations conséquentes à une dénervation.

En plus de l'examen EMG classique, les signes d'une dénervation peuvent être montrés par plusieurs autres tests comme :

-l'EMG sur fibre unique

-l'analyse d'amplitude et la décomposition de l'EMG

-l'estimation du nombre d'unités motrices.

Ce test seul ne permet pas de poser le diagnostic du patient mais permet de l'orienter, en éliminant d'autres pathologies motrices comme le syndrome pyramidal (upper motor neuron syndrome) dans lequel les patients ne présentent pas d'activité spontanée du muscle consécutive à une dénervation.

### L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM est une technique non invasive permettant d'étudier la structure en 2 ou 3 dimensions de tissus mous comme le cerveau ou la moelle épinière. Il s'agit d'une technique communément employée pour le diagnostic de la SLA. Des études ont montré chez des patients déjà diagnostiqués pour la SLA, une réduction de la densité de la matière grise au niveau de plusieurs structures comme le cortex moteur mais également l'hippocampe droit et le cortex insulaire droit. Cette asymétrie reflète la latéralité initiale des symptômes mais ne désigne pas nécessairement le côté du corps le plus atteint au cours de la maladie. Il a également été montré que le site d'apparition de la maladie au niveau des membres inférieurs ou supérieurs n'était pas lié à la prédominance d'un membre par rapport à l'autre (Devine et al., 2013). Progressivement, ces altérations asymétriques se reproduisent dans l'autre hémisphère. On observe également une réduction de l'épaisseur globale des couches corticales. Cependant, ces altérations n'ont été détectées que chez les patients présentant des symptômes moteurs (Bede and Hardiman, 2018, Simon et al., 2017).

### Biomarqueurs

L'identification de biomarqueurs dans le sang et le LCR représente un enjeu important dans le diagnostic de cette pathologie. En effet, beaucoup d'études portent sur la découverte de biomarqueurs permettant un aiguillage plus rapide vers le bon diagnostic. De nombreux marqueurs sériques ont été mis en évidence chez les patients, principalement des médiateurs inflammatoires comme les immunoglobulines de type G (IgG), le TGF $\beta$ , HMGB1 ou des chimiokines (MCP1) (Houi et al., 2002, Hwang et al., 2013, Ilzecka et al., 2002, Simpson et al., 2004). Les patients atteints de SLA présentent également une concentration plus élevée en marqueurs de stress oxydatif comme le malondialdéhyde ou le 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (Blasco et al., 2017). Enfin, une étude a montré que la concentration sérique en certains acides-aminés, comme la valine ou la leucine était plus faible chez les patients SLA (Ilzecka et al., 2003).

L'autre source de biomarqueurs diagnostiques est le LCR, avec notamment le plus connu et étudié : les chaînes légères du neurofilament dont la quantité augmente fortement chez les patients SLA (Gille

et al., 2018). Récemment, une méta-analyse a été menée, compilant les données protéomiques de 11 publications menées sur le LCR de patients diagnostiqués pour la SLA. Le recoupement de ces données a permis de mettre en évidence 10 protéines dont la quantité était modifiée dans le LCR de patients dans au moins 2 cohortes indépendantes. Parmi ces protéines, on trouve CYSC (cystatin c), un inhibiteur de protéase aux propriétés neuroprotectrices dont la quantité diminue chez les patients. On observe également une diminution de VGF (VGF nerve growth factor inductible), facteur neuronal intervenant dans la plasticité synaptique et les troubles dépressifs (Barschke et al., 2017, Jiang et al., 2017). On retrouve des différences au niveau des concentrations des MMP2 et MMP9 (métalloprotéinases matricielles), respectivement augmentée et diminuée dans le LCR des patients SLA (Niebroj-Dobosz et al., 2010). Le facteur gliale GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) est également augmenté dans le LCR des patients SLA (Grundstrom et al., 2000). Enfin, plusieurs études ont montré une augmentation des concentrations en ascorbate et en glutamate dans le LCR des patients SLA (Blasco et al., 2013, Spreux-Varoquaux et al., 2002).

Un dernier type de biomarqueurs a été étudié ces dernières années, il s'agit des microARN. Les données récemment publiées montrent une augmentation de la proportion des petits ARN (moins de 40 nucléotides) dans le plasma des patients SLA et plus particulièrement, une dérégulation de plusieurs dizaines d'entre eux, notamment miR-206, induit dans le sang de patients et dans celui de souris SOD1<sup>G93A</sup> (Takahashi et al., 2015, Toivonen et al., 2014, Waller et al., 2017).

La limite de ces biomarqueurs est double. Premièrement, certains sont également retrouvés dans d'autres maladies neurodégénératives comme MCP1 ou les chaînes légères du neurofilament chez certains patients Alzheimer (Fenoglio et al., 2004, Mattsson et al., 2016). Ensuite, la plupart de ces marqueurs ne sont induits ou réprimés qu'à des stades symptomatiques, dès lors, ils ne permettent pas d'agir en amont du développement des symptômes. Leur principal intérêt est d'entériner ou non le diagnostic de SLA chez des patients présentant des symptômes moteurs proches de ceux d'une SLA.

### Biopsie musculaire

Il est également possible de réaliser une biopsie musculaire afin de mettre en évidence une dénervation du muscle ainsi qu'une atrophie des fibres musculaires par histologie. Des études ont montré que le muscle était également une source de biomarqueurs diagnostiques de la SLA. On observe une induction de *NOGO A* (neurite outgrowth inhibitor A) associée à une diminution de *NOGO C* ainsi que l'induction d'autres gènes comme *CHRNA1* (cholinergic receptor nicotinic alpha 1 subunit), *CHRNA1* et *MYOG* (myogenin) au niveau du muscle deltoïde des patients SLA (Dupuis et al., 2002, Pradat et al., 2012). Néanmoins, la douleur occasionnée par ce prélèvement ne le rend pas indispensable.

## e. Pronostic et évaluation de la progression de la maladie

- Facteurs pronostiques

Si aucun des facteurs cités précédemment ne permet actuellement d'établir un diagnostic rapide de la maladie, il existe en revanche de nombreux facteurs pronostiques qui influencent sa progression. C'est le cas de l'âge d'apparition des symptômes qui est inversement proportionnel à la survie du patient, de l'indice de masse corporel (IMC) et de la spirométrie, c'est-à-dire la capacité pulmonaire des patients. Ces deux dernières composantes sont positivement corrélées à l'espérance de vie des patients.

La forme de SLA intervient également dans le pronostic. En effet, il a été montré que les patients atteints de formes spinales ont une espérance de vie supérieure à ceux atteints de formes bulbaires. Les formes respiratoires quant à elles présentent la progression la plus rapide.

Certains de ces paramètres peuvent également en influencer d'autres comme l'âge d'apparition des symptômes, qui, lorsqu'il est élevé (supérieur à 70 ans), donne plus fréquemment lieu à des formes bulbaires. Le délai nécessaire à l'établissement du diagnostic permet également d'estimer l'évolution de la maladie. En effet, les patients les plus rapidement diagnostiqués sont ceux présentant une évolution de la maladie plus rapide, et donc auront un pronostic défavorable.

Enfin, de nombreux facteurs inhérents aux conditions de vie de chaque patient entrent en compte dans l'évolution de la pathologie comme le statut nutritionnel, même si aucune étude n'a encore réellement traité de ce paramètre (Bourke et al., 2006, Chio et al., 2002, Czaplinski et al., 2006, Haverkamp et al., 1995, Louwerse et al., 1997, Moura et al., 2015, Traxinger et al., 2013, Tysnes et al., 1991).

- L'ALSFRS-R

L'évaluation des symptômes et l'évolution de la pathologie peuvent être suivies par l'« Amyotrophic Lateral Sclerosis Functionnal Rating Scale Revised» (ALSFRS-R). Il s'agit d'une échelle d'évaluation des capacités motrices d'un patient atteint de la SLA. Ce questionnaire permet de mesurer le handicap moteur du patient et de suivre la progression de ce handicap. Les données récoltées permettent aussi au patient d'estimer son espérance de vie (Cedarbaum et al., 1999) (Figure 4).

Bulbaire	Motricité fine	Motricité globale	Respiration
<u>1. Parole</u> 4. normale 3. perturbations détectables 2. intelligible avec répétition 1. utilise occasionnellement une communication non verbale 0. perte de la parole		<u>7 Mobilisation au lit</u> 4. normale 3. lenteur et maladresse mais autonome 2. ajuste les draps avec difficulté 1. peut bouger mais pas se retourner dans le lit 0. dépendant	
<u>2. Salivation</u> 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		<u>8 Marche</u> 4. normale 3. difficultés de déambulation 2. marche avec assistance 1. mouvements sans déambulation 0. pas de mouvement des jambes	
<u>3 Déglutition</u> 4. alimentation normale 3. quelques fausses routes 2. consistance des aliments modifiée 1. suppléments alimentaires 0. alimentation parentérale exclusive		<u>9 Montée d'escaliers</u> 4. Normale 3. lente 2. fatigue 1. aide nécessaire 0. impossible	
<u>4. Ecriture</u> 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		<u>10 Dyspnée</u> 4. absente 3. à la marche 2. dans une ou plus des situations suivantes : repas, toilette, habillage 1. au repos, difficultés respiratoires en position assise ou allongée 0. difficulté importante, envisage l'utilisation d'un appareil de ventilation mécanique	
<u>5 Hygiène</u> 4. normale 3. autonome mais avec efficacité diminuée 2. assistance occasionnelle ou substitution 1. assistance d'une tierce personne requise 0. assistance permanente totale		<u>11 Orthopnée</u> 4. Absente 3. quelques difficultés pour dormir la nuit en raison d'un souffle court, n'utilise habituellement pas plus de 2 oreillers 2. besoin de plus de 2 oreillers pour dormir 1. ne peut dormir qu'assis 0. ne peut pas dormir	
<u>6 Préparation des aliments</u> 4. normale 3. lente et maladroite mais seul 2. aide occasionnelle pour couper les aliments 1. les aliments sont préparés mais mange seul 0. doit être nourri		<u>12 Insuffisance respiratoire</u> 4. absente 3. utilisation intermittente d'une assistance ventilatoire 2. utilisation continue d'une ventilation non invasive la nuit 1. utilisation continue d'une ventilation non invasive jour et nuit 0. ventilation mécanique invasive par intubation ou trachéotomie	

Figure 4 : Tableau de l'ALSFRS-R

L'utilisation de ce tableau permet aux patients atteints de SLA de déterminer leur score ALSFRS-R. Ce score est inversement proportionnel au degré de leur handicap. Les différents critères sont regroupés en 4 catégories qui sont les symptômes bulbaires, la motricité globale, la motricité fine et les symptômes respiratoires (Adapté de (Cedarbaum et al., 1999)).

## f. Thérapies

- Traitements médicamenteux

Actuellement, il existe deux agents thérapeutiques destinés aux patients atteints de la SLA :

### Le riluzole :

Développé dans les années 1950 comme relaxant musculaire, puis utilisé en tant qu'agent anticonvulsant ou tout simplement neuroprotecteur, le riluzole a été officiellement approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) pour le traitement de la SLA en 1995. Il s'agit du premier traitement mis au point pour la SLA et, même si ses effets sont controversés, un grand nombre de patients l'utilise (Doble, 1996).

Bien que certains de ses effets soient bien caractérisés, les mécanismes d'action de cette molécule ne sont pas encore parfaitement compris. Le riluzole réduit l'excitotoxicité glutamatergique en augmentant l'expression et l'activité des transporteurs de types TAAE (transport des acides-aminés excitateurs) dans des cultures primaires d'astrocytes murins (Carbone et al., 2012). Cela limite l'activation des neurones postsynaptiques associée à la libération massive de calcium intra-neuronale. Le riluzole permet également de réduire la libération de glutamate au niveau de la fente synaptique et inhibe les récepteurs non NMDA (acide *N*-méthyl-D-aspartique) glutamatergiques (Bellingham, 2011, Cheah et al., 2010).

Les effets du riluzole sur la survie des patients sont plutôt faibles de par l'importante hétérogénéité des réponses au traitement. En moyenne, il augmente l'espérance de vie des patients de 2 à 3 mois. Le riluzole semble avoir un effet plus marqué dans les formes bulbaires que dans les formes spinales. Dans une étude sur des patients italiens, le riluzole a permis la réduction de la mortalité durant la première année de traitement. En revanche, au-delà de 18 mois de traitement, le taux de mortalité était le même dans les groupes placebo ou riluzole (Miller et al., 1996, Zoccolella et al., 2007).

De plus, cet agent thérapeutique présente des effets secondaires non négligeables. En effet, le riluzole provoque chez la plupart des patients des effets indésirables parmi lesquels les plus fréquents sont somnolence, nervosité, anorexie, maux de tête et anxiété (Groeneveld et al., 2003).

### L'Edaravone :

Déjà connu pour son rôle neuroprotecteur dans les cas de lésions cérébrales, l'Edaravone a été approuvé dans le cadre de traitement de la SLA au Japon en 2015 et aux Etats-Unis en 2017. Il s'agit d'un antioxydant peu spécifique permettant l'élimination de radicaux libres naturellement générés par les cellules (Higashi et al., 2006). Des études ont montré son fort potentiel antioxydant par rapport à d'autres molécules de ce type comme le trolox, l'analogue hydrosoluble de la vitamine E, un antioxydant naturel. Les essais cliniques en double aveugle ont mis en évidence un score ALSFRS

plus élevé ainsi qu'un meilleur maintien des capacités pulmonaires des patients traités à l'Edaravone (Group, 2017, Kamogawa and Sueishi, 2014, Kikuchi et al., 2009, Lapchak and Zivin, 2009, Rothstein, 2017).

- Thérapie non médicamenteuse

En parallèle des agents pharmacologiques, il a été développé tout un panel de thérapies non médicamenteuses permettant d'améliorer les conditions de vie des patients, voire d'allonger leur espérance de vie.

L'exercice :

L'exercice physique, en fonction de sa nature et de son intensité, peut avoir des effets bénéfiques ou néfastes sur la santé des patients. En effet, il est recommandé aux patients une activité physique modérée. Des études ont montré dans des modèles murins de SLA une survie et des performances motrices supérieures chez les souris pratiquant une activité physique modérée par rapport à une activité intense ou une inactivité (Carreras et al., 2010, Kirkinetzos et al., 2003, Mahoney et al., 2004).

Les exercices d'aérobies permettent d'améliorer les fonctions cardiaques et pulmonaires. Deforges et al ont notamment démontré que la natation avait un impact positif sur la survie des motoneurons et retardait l'apparition des symptômes dans un modèle murin de SLA (Deforges et al., 2009). Dans ce même modèle, l'effet bénéfique de la natation a également été observé au niveau musculaire, avec une induction du métabolisme glucidique et une diminution du stress oxydatif (Desseille et al., 2017, Flis et al., 2018). Les types d'exercices recommandés sont les étirements, qui permettent de soulager les crampes musculaires et de limiter les douleurs et la rigidité des muscles. Des mouvements des articulations sont également conseillés si le patient en est capable. En revanche, les exercices de renforcement sont fortement déconseillés, provoquant des effets délétères sur sa santé.

La nutrition :

La malnutrition ou la sous-nutrition sont deux problèmes majeurs rencontrés par les patients atteints de SLA, la dépression ou les difficultés de déglutition les favorisant. C'est pourquoi le statut nutritionnel des patients doit être suivi avec rigueur. Plusieurs méthodes permettent d'évaluer ce paramètre. Cet examen commence généralement par une description de son alimentation par le patient mais sa difficulté à parler ou son estimation approximative rendent cette analyse insuffisante. Aussi, cet examen se complète par l'évaluation de 4 paramètres : (Desport et al., 1999, Desport et al., 2000, Frisancho, 1981) :

-La perte de poids

-L'indice de masse corporelle ( $IMC = \text{masse}/\text{taille}^2$ )

-L'épaisseur cutané du triceps (évaluation de la masse grasse).

-La circonférence des muscles des avant-bras (évaluation de la masse maigre)

A cela viennent parfois s'ajouter deux examens considérés comme facultatifs de par les désagréments qu'ils causent aux patients. Le premier d'entre eux, l'« analyse d'impédance bioélectrique » (AIB) permet de mesurer la résistance du corps par application d'un courant électrique. Cette résistance est directement corrélée à la composition du corps en masses grasse et maigre. Ensuite, l'absorptiométrie biphotonique à rayons X consiste à mesurer l'absorption de rayons X d'un corps. Comme pour l'AIB, cette valeur donnera une estimation des masses grasse et maigre du patient. Généralement, les patients atteints de SLA présentent une diminution de la masse maigre (Nau et al., 1995).

En plus de ces suivis, il existe une méthode utilisée à partir d'une certaine avancée de la pathologie (diminution trop importante de l'IMC, perte de poids, fonctions respiratoires insuffisantes) appelée la nutrition entérale. Il s'agit d'un mode d'administration des aliments autre qu'oral. Dans le cas de la SLA, on utilise principalement la gastrostomie endoscopique percutanée (Greenwood, 2013).

## B. La Démence FrontoTemporale

### a. Historique

La Démence FrontoTemporale (DFT) est une maladie neurodégénérative dont le premier diagnostic remonte à 1892. Le médecin auteur du diagnostic, Arnold Pick, a nommé ce syndrome la maladie de Pick. Son patient présentait une aphasia et une démence présénile, ainsi qu'une atrophie des lobes corticaux. Par la suite, au vue de la signature histopathologique de la maladie, elle a été renommée Démence FrontoTemporale ou Démence Lobaire FrontoTemporale.

### b. Epidémiologie

- Incidence et prévalence

La DFT est la forme de démence la plus répandue après la maladie d'Alzheimer. Elle est dite présénile car elle se déclare préférentiellement chez les individus âgés de moins de 65 ans. Sa prévalence varie en fonction des zones géographiques. En Italie, elle est de 30 pour 100.000 individus âgés de 45 à 65 ans (Borroni et al., 2011), de 15 individus pour 100.000 en Angleterre (Ratnavalli et al., 2002) dans une population de moins de 65 ans et encore plus faible aux Pays-Bas (9.4/100.000) (Rosso et al., 2003b) et au Japon (2/100.000) (Ikejima et al., 2009). On dénombre en moyenne 2 à 4 nouveaux cas de DFT par an pour 100.000 individus (Coyle-Gilchrist et al., 2016, Knopman et al., 2004, Mercy et al., 2008). Le lien entre la prévalence de la maladie et le sexe des individus n'a pas été clairement mis en évidence. Cependant, il semblerait que dans certains cas génétiques, notamment des mutations au niveau du gène *PGRN* (*progranulin*), les femmes soient davantage prédisposées à la DFT que les hommes (Curtis et al., 2017, Hogan et al., 2016).



- Facteurs de risque

Comme pour la SLA, le principal facteur endogène lié à la DFT est la génétique que je détaillerai plus tard. Les traumatismes crâniens et le diabète sont deux facteurs prédisposant à la DFT. En revanche, l'hypertension ou encore l'hyperlipidémie n'ont pas d'impact sur le développement de la DFT. (Golimstok et al., 2014, Kalkonde et al., 2012). De manière générale, les risques de développer des démences préséniles sont plus élevés chez les individus présentant de faibles aptitudes cardiovasculaires ou de faibles performances intellectuelles (Nyberg et al., 2014). Cependant, de par la rareté des patients, très peu d'études concernant les facteurs environnementaux ont été menées, ces dernières ne montrant pas d'effet des pesticides, du tabac ou de la consommation d'alcool sur l'incidence de la DFT (Rosso et al., 2003a). Que ce soit pour la DFT ou les démences dans leur ensemble, les résultats des différentes études semblent être en désaccord, soulevant l'hypothèse d'un effet synergique de plusieurs facteurs (Forster et al., 1995, McLachlan et al., 1996).

### c. Tableau clinique

La DFT a tout d'abord été caractérisée, d'un point de vue histologique par une atrophie progressive de la partie antérieure du cerveau et plus particulièrement des lobes frontaux et temporaux du cortex cérébral, de l'hippocampe, du cortex cingulaire et du cortex insulaire (Boccardi et al., 2003, Frisoni et al., 1996, Laakso et al., 2000, Rosen et al., 2002). Cette dégénérescence est asymétrique et de l'hémisphère le plus précocement atteint peut dépendre la nature des troubles phénotypiques du patient. Une dégénérescence plus prononcée de l'hémisphère droit semble induire plus fréquemment chez les patients des troubles sociaux comme la perte d'empathie ou la maladresse sociale. La dégénérescence de l'hémisphère gauche est davantage associée à des troubles aphasiques comme une difficulté à trouver ses mots (Thompson et al., 2003). En fonction des zones les plus atteintes et donc les plus atrophiées, les symptômes des patients vont être différents. Ce spectre complexe de troubles comportementaux a donné 4 formes de DFT :

- La variante comportementale (Behavior variant FrontoTemporal Dementia) :

Cette forme de DFT est la plus répandue. Elle représente environ 60% des cas. Les patients développent progressivement des troubles sociaux comme une désinhibition (comportement inapproprié, impulsivité, absence de gêne), une perte d'empathie, de l'agressivité, une négligence de l'hygiène mais aussi des changements émotionnels (apathie, dépression, irritabilité) ou des modifications du comportement alimentaire (suralimentation, absence de discrimination des aliments) ainsi que des stéréotypies comportementales.

Les trois autres formes sont regroupées sous le nom d'aphasie primaire progressive (APP) :

- La variante grammaticale:

Dans cette forme d'APP, la plupart des symptômes décrits ci-dessus sont absents hormis l'irritabilité et l'apathie. Cette forme de DFT est reconnaissable par les troubles linguistiques développés par le patient. Il présente un discours lent, saccadé et oublie ou confond la signification de certains mots. Il peine à comprendre certaines constructions de phrases (ex : la fille que le garçon aime s'est levée) alors que les phrases plus simples dont le sens est identique ne lui pose aucun problème de compréhension (ex : le garçon aime la fille, cette fille s'est levée). L'apraxie des muscles liés au langage ainsi que la dyslexie sont également deux troubles souvent associés à cette forme d'APP.

- La démence sémantique :

Les patients atteints de cette forme de DFT présentent un tableau clinique associant ceux des deux formes précédentes avec de l'agressivité, une négligence de soi, une hyperémotivité, des comportements compulsifs, mais aussi une agnosie (difficulté à comprendre certains mots ou à nommer certains lieux ou noms). Cette forme serait davantage associée à une dégénérescence des lobes temporaux antérieurs et de l'amygdale.

- La variante logopénique (ou phonologique) :

Cette forme d'APP a été la dernière diagnostiquée. La principale caractéristique de cette variante est la perturbation de la boucle phonologique qui correspond à une branche de la mémoire du travail impliquée dans le stockage d'informations verbales ou phonologiques (en relation avec les lettres, les mots et les chiffres). Les patients présentent des difficultés à retenir des séries, mêmes courtes, de chiffres, lettres ou mots. Ils articulent correctement et font peu de fautes grammaticales. Toutefois, ils parlent lentement et font de longues pauses afin de chercher leurs mots (Gorno-Tempini et al., 2008).

Les symptômes retrouvés dans chacune de ces formes de DFT peuvent s'accompagner d'autres troubles comportementaux comme des altérations de la motricité (en lien avec la SLA ou la maladie de Parkinson), des hallucinations, des troubles de la mémoire ou du sommeil.

#### d. Diagnostic

- Critères

L'hétérogénéité des symptômes de la DFT et les similitudes symptomatiques avec d'autres maladies entraînent des difficultés de diagnostic, lequel est généralement posé 3 à 4 ans après l'apparition des premiers symptômes. L'espérance de vie moyenne après la pose du diagnostic est comprise entre 6,5 et 9 ans (Hodges et al., 2003, Knopman and Roberts, 2011).

En 1998, un consensus clinique visant à permettre un diagnostic plus rapide de chacune de ces formes de DFT dresse un tableau récapitulatif des symptômes liés à chacun de ces cas (Neary et al., 1998). Cependant, ces critères présentent des faiblesses, notamment le fait que les critères décrits par Neary et al en 1998 sont absents de la plupart des patients lors des phases précoces de la maladie. C'est pourquoi en 2011, le consortium des critères de la DFT établit et publie un ensemble de critères permettant de diagnostiquer plus aisément les formes comportementales de DFT (BvFTD) (Rascovsky et al., 2011). Dans cette étude, Rascovsky et al ont démontré la robustesse de leurs critères face à la méthode de Neary et al.

Comme pour la SLA, le diagnostic posé peut être :

- Une DFT comportementale **possible** si au moins 3 des critères suivants sont présentés par le patient :
  - une désinhibition précoce identifiée par un comportement social inapproprié, une perte de manière en société ou des actions imprudentes
  - une apathie ou une inertie
  - une perte d'empathie identifiée par une diminution de sentiments vis-à-vis des autres ou une perte d'intérêt social.
  - une apparition de comportements stéréotypés
  - un changement du comportement alimentaire ou une hyperoralité
  - une altération des fonctions exécutives et spatio-visuelles.
  
- Une DFT comportementale **probable** si l'ensemble des symptômes suivants sont présentés par le patient :
  - développement de 3 des 6 critères cités précédemment
  - déclin fonctionnel évident
  - évidence d'une atrophie des cortex frontaux et temporaux par neuro-imagerie.
  
- Une DFT **établie** si le patient présente les symptômes d'une DFT probable associés à l'un des deux critères suivants :
  - évidence histopathologique de DFT
  - découverte d'une mutation en lien avec la DFT.

L'hypothèse d'une DFT est éliminée si le patient présente des altérations comportementales en lien avec une autre pathologie ou si les biomarqueurs mis en évidence sont associés à une autre maladie.

- Examens cliniques

Le premier examen aiguillant le neurologue vers la DFT est l'évaluation du comportement de son patient à travers plusieurs entretiens avec lui mais aussi avec son entourage. Cependant, comme précisé précédemment, les troubles comportementaux ne suffisent pas à définir une DFT. C'est pourquoi d'autres approches sont nécessaires afin de définir clairement le statut du patient.

### Neuro-imagerie

Afin de diagnostiquer la DFT chez un patient, l'outil le plus robuste est l'imagerie. Elle permet de distinguer les patients atteints de DFT de ceux atteints d'une autre maladie neurodégénérative mais aussi de distinguer les différentes formes de DFT par observation d'altérations au niveau de la substance grise et de la substance blanche.

La substance grise :

L'IRM volumétrique permet tout d'abord de déterminer le volume moyen du cerveau ou des différentes structures qui le compose. L'étude du niveau d'atrophie cérébrale a permis de montrer une atrophie plus importante au niveau des régions orbito-frontal, temporal antérieure et médiane et du cortex cingulaire antérieur chez les patients atteints de DFT en comparaison à des patients sains, Alzheimer ou atteints de la démence à corps de Lewy (Harper et al., 2016). Il est également possible de distinguer les formes sémantiques des formes grammaticales ou logopéniques de par le site d'atrophie primaire: les formes sémantiques entraînent d'abord une atrophie temporo-pariétale et fronto-insulaire alors que les formes grammaticales sont davantage liées à une atrophie temporale antérieure (Figure 5) (Gorno-Tempini et al., 2004, Rogalski et al., 2011). Une étude de 2015 a également mis en évidence le caractère précoce de l'atrophie de certaines régions cérébrales chez des individus prédisposés à la DFT (porteurs d'une mutation en lien avec la DFT ou présentant des antécédents familiaux) qui ont été suivis plusieurs dizaines d'années avant et après l'apparition des symptômes. La diminution du volume du cerveau ainsi que l'atrophie des lobes temporaux et insulaires sont visibles 10 ans avant le diagnostic et pourraient servir de facteurs de risque diagnostique dans la prise en charge des patients (Rohrer et al., 2015).

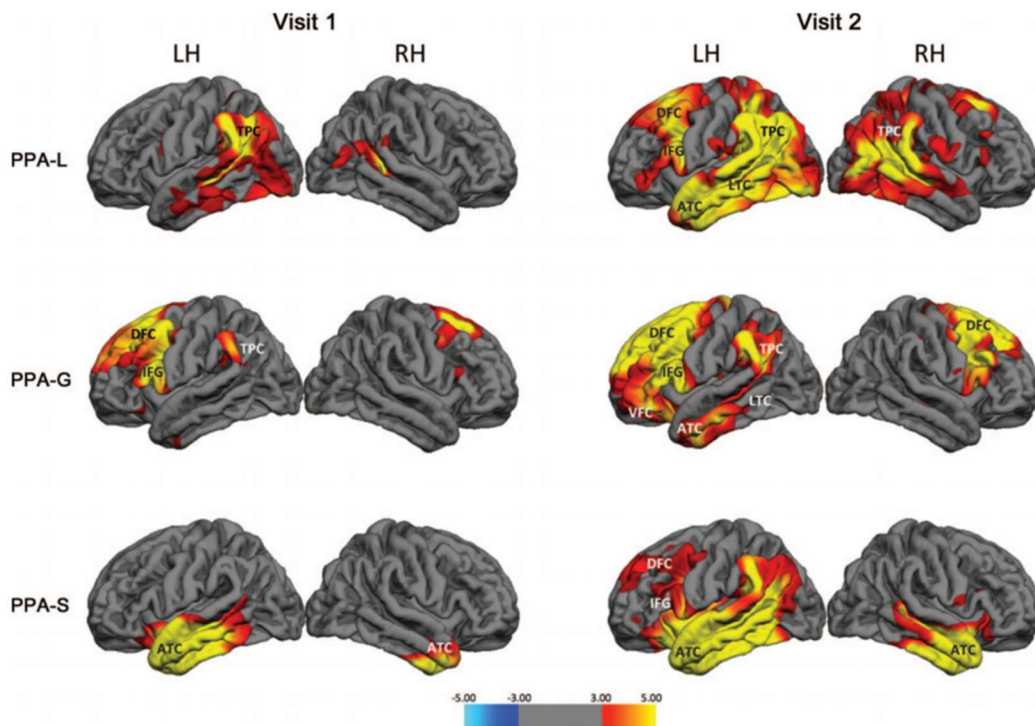


Figure 5 : Evolution de l'atteinte de la substance grise dans différentes formes de DFT

Les patients ont subi une IRM peu après leur diagnostic (visite 1) puis deux ans plus tard (visite 2) afin de suivre la progression de l'atrophie cérébrale. Dans les démences sémantiques, les principales zones atteintes sont les lobes temporaux. Dans la forme grammaticale, les patients présentent une atrophie importante des lobes frontaux et enfin, dans les formes logopéniques les premières zones affectées sont situées au niveau postérieur de l'encéphale. ATC=Cortex antérieur temporal; DFC = Cortex Frontal Dorsal ; IFG = Gyrus Frontal Inférieur; LH = Hémisphère Gauche ; LTC = Cortex Temporal Latéral; PPA-G = sous-type Aphasie Primaire Progressive (grammaticale) ; PPA-L = sous-type Aphasie primaire progressive (logopénique) ; PPA-S = sous-type Aphasie Primaire Progressive (sémantique) ; RH = Hémisphère droit ; TPC = Cortex Temporal ; VFC = Cortex Frontal Ventral. Image tirée de (Rogalski et al., 2011).

La substance blanche :

L'étude de la substance blanche nécessite une technique appelée « imagerie par tenseur de diffusion ». Cette technique consiste à étudier les mouvements anisotropes (dépendant d'une direction, ici parallèlement à l'axe des fibres de la substance blanche) des molécules d'eau dans les fibres myélinisées du cerveau. Cette méthode permet également de discriminer les DFT d'autres démences. Contrairement aux altérations de la substance grise, les altérations au niveau de la substance blanche sont symétriques et affectent simultanément les deux hémisphères. Les faisceaux les plus altérés concernent les projections du lobe frontal antérieur et les projections sous-corticales (Mahoney et al., 2013). D'autres réseaux majeurs de fibres sont affectés comme le corps calleux, le cingulum reliant le cortex cingulaire et l'hippocampe ainsi que le faisceau unciné reliant le cortex orbito-frontal et le cortex temporal antérieur (Mahoney et al., 2014).

Métabolisme et perfusion cérébraux :

Dans de nombreuses maladies neurologiques, il est nécessaire d'étudier le métabolisme cérébral. La technique la plus couramment utilisée est la Tomographie par Emission de Positron (TEP) avec utilisation d'un traceur radioactif, généralement le 18F-fluorodeoxyglucose. Le cerveau étant un grand consommateur de glucose, cette méthode permet d'estimer le métabolisme du cerveau et de ses sous-structures. L'une des caractéristiques de la DFT est la diminution du métabolisme de certaines zones du cerveau. Il existe d'ailleurs une corrélation entre l'atrophie de la substance grise et l'hypométabolisme, majoritairement mise en évidence au niveau du cortex frontal et du cortex temporal antérieur (Buhour et al., 2017, Diehl-Schmid et al., 2007, Morbelli et al., 2016). L'analyse métabolique est souvent corrélée à la mesure de la perfusion cérébrale. De la même manière que pour le métabolisme, les patients atteints de DFT présentent une hypoperfusion principalement au niveau du cortex cingulaire antérieur et du cortex frontal (Du et al., 2006, Steketee et al., 2016).

### Biomarqueurs

L'analyse de biomarqueurs se fait principalement au niveau du LCR mais également au niveau du sang qui est plus simple à collecter. Cet examen est généralement un complément de l'imagerie qui a déjà posée les bases d'une possible DFT. En premier lieu, la quantité de protéines TAU phosphorylées et protéines  $\beta$ -amyloïdes est mesurée au niveau du LCR afin d'écarter la maladie d'Alzheimer (Struyfs et al., 2015). En effet, même chez les patients atteints d'une DFT et porteurs d'une mutation dans le gène *MAPT*, la concentration en protéine TAU est sensiblement la même que celle d'individus sains (Bian et al., 2008). A l'inverse, le taux de chaîne légère de neurofilament (NFL) est beaucoup plus important dans le LCR des patients atteints de DFT que dans celui des individus sains (Meeter et al., 2016b) ou atteints de la maladie d'Alzheimer (Scherling et al., 2014). Bien que moins discriminatoire, la quantité de NFL dans le sérum permet aussi d'identifier les patients DFT (Wilke et al., 2016).

Il existe également des biomarqueurs spécifiques à certaines mutations. C'est le cas d'une mutation du gène *PGRN* (*progranulin*) qui entraîne chez les patients une diminution de plus de 50% de la quantité de la protéine dans le LCR et dans le sang (Meeter et al., 2016a) ou pour les mutations en lien avec *C9ORF72* (*chromosome 9 open reading frame 72*) qui entraînent une diminution des quantités sérique et cérébrospinale de protéines poly(GP) (protéines portant des motifs Glycine-Proline de manière répétée comme *C9ORF72*) (Gendron et al., 2017).

### e. Thérapies

- Traitements médicamenteux

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement visant à ralentir la progression de la maladie. De par l'hétérogénéité des symptômes développés par les patients, très peu d'essais cliniques ont été réalisés. Ainsi, les traitements prescrits aux patients n'auront qu'une visée palliative, en limitant les troubles comportementaux et sont généralement déjà employés dans d'autres formes de démence.

Inhibiteurs de la recapture de la sérotonine :

Des études sur des tissus de patients atteints de DFT ont montré une diminution de la quantité de récepteurs à la sérotonine au niveau des cortex frontaux et temporaux (Procter et al., 1999). La sérotonine étant un neurotransmetteur essentiel dans la régulation de l'humeur, plusieurs inhibiteurs de la recapture de sérotonine ont été utilisés dans le traitement de la DFT. La plupart d'entre eux sont des antidépresseurs. Chow and Mendez ont étudié les effets de la paroxétine, un antidépresseur commercialisé, sur les troubles comportementaux de patients DFT. Le traitement a permis une réduction des troubles obsessionnels compulsifs chez près de 75% des patients (Chow and Mendez, 2002). Le trazodone a également montré des effets bénéfiques sur le comportement des patients (appétit, irritabilité, agitation) (Lebert et al., 2004).

Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et antagonistes des récepteurs NMDA :

Chacune de ces deux classes de molécules a été testée dans des cas de DFT sous la forme de plusieurs composés. Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase les plus connus sont la donépézil, la rivastigmine, et la galantamine. Dans la quasi-totalité des essais cliniques menés, le traitement a été soit inefficace soit délétère pour les patients (Arciniegas and Anderson, 2013, Kertesz et al., 2008, Mendez et al., 2007). Des résultats similaires ont été obtenus avec la mémantine, un antagoniste des récepteurs NMDA utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Boxer et al., 2013, Vercelletto et al., 2011).

- Thérapies non médicamenteuses

Les effets de ce type de thérapie divergent en fonction des formes de DFT mais aussi en fonction des patients. Elles visent principalement à soulager le quotidien du patient et à améliorer ses conditions de vie. Ces méthodes peuvent passer par la pratique d'une activité physique régulière (en particulier dans les cas de DFT associés à des troubles moteurs) ou par une thérapie linguistique dirigée par un professionnel. La thérapie passe également par une étape de compréhension de son handicap par le patient, la nécessité de compenser ses handicaps et de rester autonome le plus possible (Kortte and Rogalski, 2013).

## 2. Origines génétiques de la SLA et de la DFT

Le principal facteur connu à l'origine de ces deux pathologies est associé à des mutations génétiques. Depuis 1993 et la découverte de la première mutation en lien avec la SLA, des centaines de mutations affectant plus d'une vingtaine de gènes ont été mises en cause dans le développement de la SLA et/ou de la DFT (Figure 6). La plupart de ces mutations sont à caractère dominant et présentent une forte pénétrance.

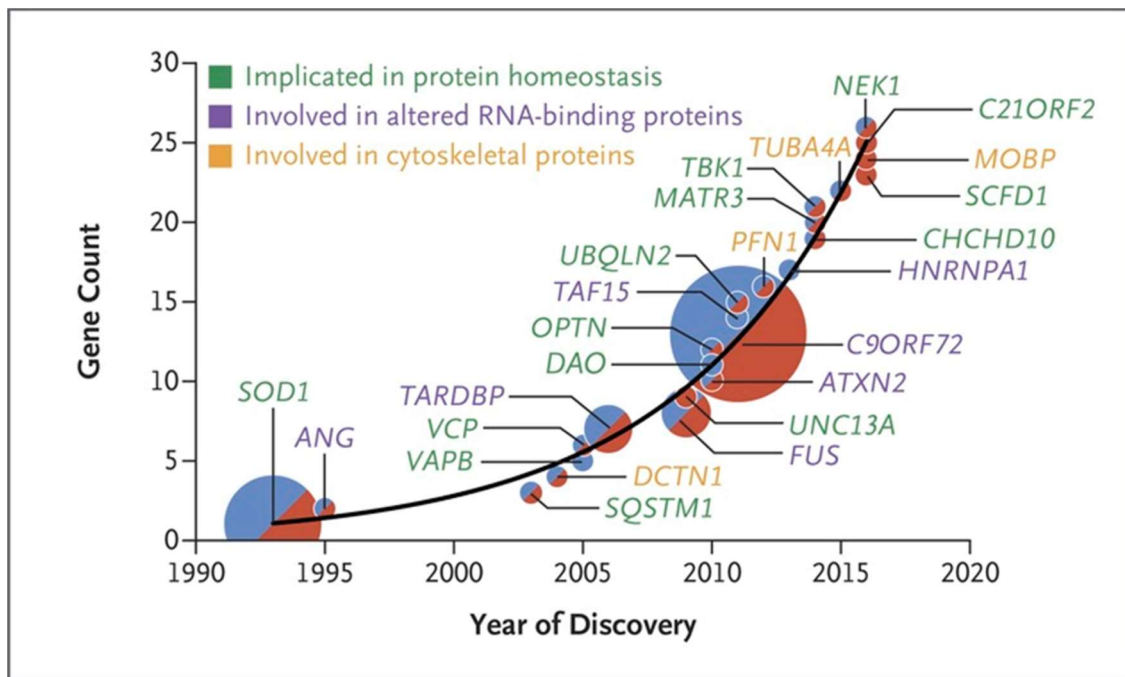


Figure 6 : Gènes de la SLA découverts et fonctions associées

La taille des cercles reflète la proportion de cas de SLA familiale pour chaque gène. Les cercles bleus indiquent que le gène a été identifié dans des cas de SLA familiale et les cercles rouges concernent les cas sporadiques. Plus de 20 gènes sont aujourd’hui connus comme étant impliqués dans la SLA. Ces gènes codent des protéines associées à trois grandes familles: les protéines associées à l’homéostasie protéique, les protéines de liaison à l’ARN et les protéines associées au cytosquelette. Image tirée de (Brown and Al-Chalabi, 2017).



On classe généralement les cas de SLA et de DFT en deux catégories : les cas familiaux et les cas sporadiques. Dans les cas familiaux, le patient présente dans sa généalogie d'autres cas de la maladie. Les cas familiaux représentent 5 à 10% des cas de SLA et environ 35% des cas de DFT. Dans la SLA ou la DFT familiale, l'origine génétique de la maladie est généralement connue alors que dans les formes sporadiques, plus de 80% des cas sont d'origine inconnue (génétique ou non) (Figure 7).

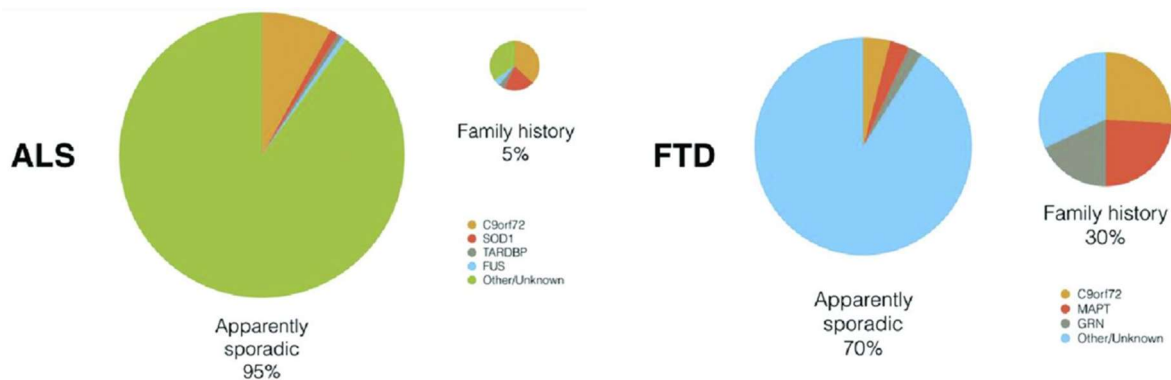


Figure 7 : Formes familiales et sporadiques dans la SLA et la DFT

Environ 95% des patients atteints de SLA ne présentent pas d'antécédents familiaux. Dans les formes familiales, les gènes connus les plus représentés sont *C9ORF72*, *SOD1* et *TARDBP*. Dans la DFT, les formes familiales représentent 30% des cas, avec en majorité des mutations au niveau des gènes *C9ORF72*, *MAPT* et *PGRN*. Image tirée de (Turner et al., 2017).

#### A. Gènes spécifiques à la SLA.

Parmi l'ensemble des gènes liés à la SLA, la plupart sont également retrouvés dans des cas de DFT ou de SLA-DFT. Il en existe cependant qui n'ont encore jamais été associés à des troubles comportementaux.

- *SOD1*

Le gène *superoxyde dismutase 1* se situe sur le chromosome 21. Il se compose de 5 exons et code une protéine de 154 acides aminés. La protéine SOD1 est une enzyme impliquée dans la protection contre le stress oxydant et les radicaux libres. Elle agit en dismutant l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Le gène *SOD1* est le premier à avoir été découvert en lien avec la SLA, en 1993 (Rosen et al., 1993). Il est la cause d'environ 20% des cas de SLA familiales et environ 2% des cas de SLA sporadiques. A ce jour, plus d'une centaine de mutations sont connues et répertoriées comme inductrices de cette maladie (Saccon et al., 2013). Etant resté le seul gène en lien avec la SLA durant plusieurs années, le gène *SOD1* est actuellement le plus étudié et le mieux caractérisé. Le cortex et la moelle épinière, mais aussi le sérum et le plasma des patients SLA portant une mutation dans le gène *SOD1* présentent une grande quantité de marqueurs de stress oxydatif (Bogdanov et al., 2000, Shaw et

al., 1995). Il a également été mis en évidence une perturbation de l'homéostasie protéique dans les tissus post mortem de patients, avec une altération du processus autophagique (Chen et al., 2015) ainsi qu'un stress du réticulum endoplasmique (RE) (Atkin et al., 2008, Kiskinis et al., 2014, Wate et al., 2005) . Afin d'étudier plus en détail les mécanismes cellulaires pathologiques développés par les patients, des modèles murins basés sur différentes mutations humaines ont été développés et caractérisés. Les mutations les plus couramment retrouvées dans les modèles murins sont G93A et G37A qui sont des mutations humaines. On retrouve également dans de nombreuses études la mutation G86R qui est l'équivalent murin de la mutation humaine G85R.

Comme chez les patients, les souris exprimant l'un de ces mutants présentent la formation d'agrégats protéiques positifs à la protéine SOD1 dans les neurones (Deng et al., 2006, Hetz et al., 2009), une déstructuration de la jonction neuromusculaire (JNM) associée à une perte des motoneurones et une paralysie progressive (Gurney et al., 1994, Ripps et al., 1995, Wong et al., 1995). Comme dans tous les cas de mutations pathologiques, la question d'un effet lié à la perte de fonction de la protéine a été soulevée. En effet, il s'avère que la plupart des mutations du gène *SOD1* répertoriées chez les patients SLA entraîne une diminution de son activité (Saccon et al., 2013). Chez la souris, l'extinction complète du gène *Sod1* semble récapituler certaines altérations retrouvées chez les patients ou dans les modèles murins de SLA comme une dénervation progressive (Kostrominova, 2010), une diminution du diamètre axonal (Flood et al., 1999) et des altérations mitochondriales (augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), de marqueurs apoptotiques et de la quantité de lactate après un exercice) (Jang et al., 2010). Pour se rapprocher d'un modèle de SLA lié au mutant *SOD1*, d'autres modèles ont été générés, dans lesquels un seul allèle du gène *Sod1* est excisé. Les souris de ces modèles présentaient des signes d'altérations mitochondriales et de dénervation mais les résultats n'étaient pas significatifs (Fischer et al., 2011). En revanche, des études ont démontré des mécanismes pathologiques par gain de fonction de la protéine SOD1 mutante. En effet, si les mutations G85R (dans le gène humain) et G86R (dans le gène murin) affectent le site catalytique de la SOD1 et lui font perdre ses capacités antioxydantes, l'activité enzymatique d'autres protéines mutantes SOD1 n'est que peu diminuée (G93C, I113T). Dans le cas de la mutation *SOD1*<sup>G93A</sup>, on observe même une augmentation de l'activité de l'enzyme (Borchelt et al., 1994, Yim et al., 1996). De plus, il a été montré que les protéines mutantes SOD1 peuvent non seulement former des agrégats protéiques entre elles mais également recruter des protéines SOD1 sauvages qu'elles piègent dans ces agrégats (Chattopadhyay et al., 2008). Ainsi, même si de nombreux arguments tendent à prouver l'effet pathologique du gain de fonction de la protéine SOD1 mutante, des effets de gain et de perte de fonction semblent agir en synergie dans le développement de la SLA.

- *ALS2*

Le gène *ALS2* est situé sur le chromosome 2 dans le génome humain et code la protéine ALSIN 2. Ce gène a été le deuxième gène découvert en lien avec la SLA (Yang et al., 2001) après le gène *SOD1*. A la différence de la plupart des autres mutations en lien avec la SLA, les mutations du gène *ALS2* concerne les deux allèles. Il est associé à des formes juvéniles rares de SLA (moins de 1%). Les symptômes apparaissent ici entre 3 et 20 ans, menant à la mort prématurée du patient (Chen et al., 2013). La protéine codée par le gène *ALS2* comporte plusieurs domaines de type « facteur échangeur de guanine » qui lui permet d'activer des dizaines de protéines appartenant à plusieurs familles comme RAS, RAN ou RAB. ALSIN2 interagit notamment avec RAB5, une protéine localisée sur la membrane des endosomes précoces intervenant dans le transport des endosomes *via* les microtubules (Otomo et al., 2003). ALSIN2 joue donc un rôle prépondérant dans la dynamique endosomale. L'extinction complète de ce gène conduit à des altérations de la JNM (diminution de la taille de la jonction), une diminution de l'activité d'endocytose dans les fibroblastes (Hadano et al., 2006) et une diminution de l'internalisation de récepteurs à la surface des neurones (Devon et al., 2006).

## B. Gènes spécifiques à la DFT

Comme dans le cas de la SLA, certains gènes découverts chez des patients atteints de DFT ont par la suite été mis en évidence chez des patients développant des troubles moteurs associés à la SLA. Toutefois, plusieurs gènes sont, à ce jour, uniquement impliqués dans la DFT.

- *MAPT*

Le gène « *microtubule associated protein tau* » (*MAPT*) est un gène localisé sur le chromosome 17. Il code une protéine de 441 acides aminés appelée TAU qui se compose de plusieurs domaines dont 4 domaines répétés d'interaction avec les microtubules. Ces domaines sont codés par les exons 9 à 12. La protéine TAU se retrouve sous 6 formes différentes en fonction de son épissage. Les exons concernés par cet épissage alternatif sont les exons 2, 3 et 10. La protéine TAU subit également des modifications d'ordre post-traductionnel. On dénombre 85 sites de phosphorylation localisés sur la protéine mais également des sites de glycosylation, d'ubiquitination ou de sumoylation participant à la régulation de son activité (Martin et al., 2011). Elle est impliquée dans la stabilité des microtubules en favorisant leur assemblage ou leur désassemblage. Les formes présentant 4 domaines de liaison aux microtubules permettent un assemblage des microtubules plus important (Goedert and Jakes, 1990). Les microtubules sont essentiels pour la survie des neurones et sont nécessaire à la formation et la croissance des dendrites et de l'axone.

Découvert muté chez des patients atteints de DFT en 1998 (Hutton et al., 1998), ce gène est fortement lié à cette pathologie du fait de sa fréquence parmi les cas génétiquement identifiés (15 à 20% des DFT familiales et 3% des DFT sporadiques) ainsi que par le profil de la protéine chez les patients.

Près d'un patient sur 2 atteint de DFT présente une accumulation de protéine TAU hyperphosphorylée et insoluble, même en l'absence de mutation dans le gène *MAPT* (Crowther and Goedert, 2000, Leyton and Hodges, 2010, Ling et al., 2013). La plupart des mutations au niveau de *MAPT* chez les patients concernent les 4 exons correspondant aux domaines de liaison aux microtubules (Rademakers et al., 2004, Spillantini and Goedert, 2013). En 2011, Cohen et al ont montré que l'acétylation de la protéine TAU perturbe ses fonctions endogènes et mène à sa fibrillation (Cohen et al., 2011).

- *PGRN*

Le gène *progranulin* se situe lui aussi sur le chromosome 17 du génome humain. Il se compose de 12 exons et code une protéine de 593 acides aminés impliquée dans l'inflammation. On retrouve cette protéine sous deux formes dans la cellule : la forme totale PGRN (progranuline) et la forme clivée GRN (granuline). L'élastase permet le clivage de PGRN en plusieurs peptides GRN qui correspondent aux différents domaines de la protéine (Zhu et al., 2002). Ces deux protéines ont des effets opposés puisque la forme complète est associée à un processus de réparation et anti-inflammatoire en promouvant la migration et la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales ainsi qu'en réprimant l'expression de marqueurs pro-inflammatoires alors que la forme clivée favorise le recrutement de neutrophiles *via* une induction de *IL-8* (Guo et al., 2012, He et al., 2003).

C'est en s'intéressant aux DFT de type 17 (liées au chromosome 17) que ce gène a été découvert chez des patients atteints de DFT. En effet les gènes *MAPT* et *PGRN* se situent à moins de 2Mb l'un de l'autre sur le chromosome 17. Les premières mutations de *PGRN* en lien avec la DFT ont été rapportées en 2006. Dans cette étude, 9 mutations différentes ont été mises en évidence. Trois d'entre elles consistent en un décalage du cadre de lecture et une modification de la séquence polypeptidique, 4 sont des mutations non-sens, une autre se situe au niveau du site d'épissage et conduirait à la perte de l'exon 8. La dernière touche le site d'initiation de la traduction « ATG » et empêche la formation de la protéine (Baker et al., 2006). La même année, Cruts et al ont découvert 3 nouvelles mutations. Deux sont des mutations non-sens entraînant une troncature de la protéine à 127 et 237 acides-aminoés. La dernière affecte le site d'épissage de l'intron 0 et entrainerait (étude *in silico*) une importante diminution de l'efficacité d'interaction de cette séquence avec le complexe U1snRNP impliqué dans l'épissage (Cruts et al., 2006). Le gène *PGRN* est l'un des gènes les plus représentés dans la DFT avec environ 10% des cas de DFT totaux et environ 20% des cas familiaux (Gass et al., 2006). Il conduit à une DFT-TDP, c'est-à-dire que les inclusions protéiques intracellulaires sont positives à la protéine TDP-43. Contrairement aux autres gènes présentés, les mécanismes pathologiques liés à *PGRN* semblent être uniquement liés à une perte de fonction de la protéine. Les effets des mutations présentées précédemment semblent n'induire qu'une diminution ou une suppression de l'activité de la progranuline. De plus, les modèles murins KO pour *Pgrn* récapitulent les altérations comportementales relatives à la DFT (Ghoshal et al., 2012).

### C. Gènes du continuum SLA-DFT

Bien que certains gènes soient spécifiques à la SLA ou la DFT, la plupart d'entre eux sont retrouvés chez des patients développant les deux pathologies.

- *CHMP2B*

Le gène *CHMP2B* a été le premier gène découvert dans le syndrome SLA-DFT. Son rôle et son implication dans ces deux maladies seront abordés dans la troisième partie de l'introduction.

- *TARDBP*

Le gène « *transactive response DNA binding protein* » se situe sur le chromosome 1 et est composé de 6 exons. Il code la protéine TDP43, composée de 414 acides aminés. Elle se compose de trois domaines qui sont RRM1 (RNA Recognition Motif) qui correspond aux exons 3 et 4, RRM2 qui correspond aux exons 5 et 6 et un domaine riche en glycine qui correspond également à une partie de l'exon 6 (Wang et al., 2004). TDP43 appartient aux ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) de par ses propriétés de liaison à l'ARN (et à l'ADN). Elle possède un signal de localisation nucléaire ainsi qu'un motif d'export nucléaire lui permettant de naviguer du noyau au cytoplasme (Winton et al., 2008). Il a toutefois été démontré que la partie C-terminale de la protéine joue également un rôle dans sa localisation, probablement du fait de son rôle dans l'interaction avec d'autres hnRNP (Ayala et al., 2008).

TDP43 est impliquée dans plusieurs processus et en particulier dans ceux de transcription, d'épissage, ou de stabilisation des ARNm ainsi que de leur traduction. Elle se lie préférentiellement aux motifs répétés UG des longs ARNm notamment au niveau des introns et favorise leur expression (Polymenidou et al., 2011). Ses cibles sont impliquées dans de nombreux rôles dans le neurone comme la morphologie cellulaire, le métabolisme des ARN ou le développement (Sephton et al., 2011). En tant que facteur de transcription, *TARDBP* régule sa propre expression. En effet, les souris dont un allèle du gène a été supprimé présentent une expression de *Tardbp* similaire à celle de souris sauvages (Sephton et al., 2010).

La découverte de mutations chez des patients atteints de SLA date de 2008, puis plus tard, *TARDBP* a également été mis en lien avec le syndrome SLA-DFT (Benajiba et al., 2009, Kabashi et al., 2008, Sreedharan et al., 2008). Environ 5% des SLA familiales et 2% des SLA sporadiques sont liées à ce gène. Cependant, au niveau physiopathologique, TDP43 concerne la quasi-totalité des cas de SLA puisque dans 97% d'entre eux, on retrouve des inclusions protéiques positives à TDP43. On retrouve également ces mêmes inclusions protéiques dans 45% des cas de DFT (Ling et al., 2013). La plupart des mutations de *TARDBP* sont localisées au niveau du domaine riche en glycine (C-terminal) et conduisent à la localisation cytoplasmique de TDP43 (Chiang et al., 2016). Les mécanismes pathologiques en lien avec une mutation de *TARDBP* sont complexes et regroupent des effets de perte

et de gain de fonction. En plus de la perte de fonction de la protéine mutante qui entraîne dérégulations géniques ou instabilité des ARN, il semblerait qu'elle entraîne la formation d'agrégats contenant des ARN et des protéines appelés granules de stress (Li et al., 2015) qui sont toxiques pour le neurone (Liu-Yesucevitz et al., 2010).

- *FUS*

*Fused in sarcoma (FUS)* est un gène situé sur le chromosome 16. Il se compose de 15 exons et code une protéine de 526 acides aminés. Des études ont pu mettre en évidence différents domaines au sein de la protéine FUS comme un domaine riche en glycine qui permet à FUS d'interagir avec des protéines HDAC (histone déacétylase), un domaine RRM contenant une séquence d'export du noyau et enfin une séquence de localisation nucléaire (NLS) permettant son import dans le noyau (Dormann et al., 2010).

La protéine FUS est capable de se lier à l'ADN et à l'ARN principalement grâce à son domaine en doigts de zinc (Iko et al., 2004). FUS se lie également à des hnRNP. Cette interaction a lieu principalement avec les ARN présentant la séquence GGUG (Lerga et al., 2001). FUS est également impliquée dans l'épissage en interagissant directement avec des acteurs du spliceosome comme U1snRNP (Behzadnia et al., 2007, Sun et al., 2015).

Le gène, d'abord mis en évidence dans des cas de sarcomes a été découvert muté chez des patients atteints de SLA en 2009 (Kwiatkowski et al., 2009, Vance et al., 2009). Il représente environ 4% des SLA familiales et 1% de l'ensemble des SLA (Deng et al., 2014). Contrairement à la plupart des gènes associés à la SLA, les mutations de *FUS* entraînent l'apparition de symptômes de manière plus précoce (Rademakers et al., 2010, Tateishi et al., 2010). Dans certains cas, les symptômes apparaissent avant 20 ans (Baumer et al., 2010).

La plupart des mutations touchant le gène *FUS* sont localisées au niveau du domaine NLS et empêchent l'import du mutant FUS dans le noyau. Comme pour la plupart des autres gènes, les mécanismes pathologiques associés à FUS sont liés à une perte et à un gain de fonction. Sasayama et al ont montré que la répression de l'homologue de *FUS* chez la drosophile entraînait une diminution de la mobilité des animaux (Sasayama et al., 2012). Chez le poisson zèbre, une répression de *fus* ou une mutation (en lien avec la SLA) dans le gène entraîne une réduction de la motricité ainsi qu'une altération structurale de la JNM (découplage des marquages pré et post-synaptiques) (Armstrong and Drapeau, 2013). Enfin, Scekcic-Zahirovic et al ont également mis en évidence une dérégulation de l'expression génique en réponse avec l'extinction de *Fus* ainsi qu'une diminution du poids et de la taille des souris à la naissance. En revanche, dans cette même étude, les comparaisons des profils transcriptomiques entre les souris KO et les souris exprimant le mutant *Fus* (protéine FUS dépourvue de séquence NLS) sont différents, bien qu'une partie des gènes soient communément dérégulés dans les deux analyses (Scekcic-Zahirovic et al., 2016).

- *C9ORF72*

Les premières données concernant ce gène dans le syndrome SLA-DFT ont été publiées en 2011 par deux instituts (DeJesus-Hernandez et al., 2011, Renton et al., 2011). A défaut d'une fonction connue, son nom se réfère à sa localisation dans le génome : chromosome 9 open reading frame 72. Il s'agit actuellement du gène le plus représenté dans la SLA et la DFT. Sans prendre en compte le facteur géographique, les mutations du gène *C9ORF72* représentent environ 35% des SLA familiales, 6 % des SLA sporadiques, 25% des DFT familiales et enfin 5% des DFT sporadiques (Brettschneider et al., 2012, Lattante et al., 2012, Ratti et al., 2012, van Blitterswijk et al., 2012b). Parmi les patients SLA porteurs d'une mutation dans le gène *C9ORF72*, près de 30% présentent également des troubles comportementaux relatifs à la DFT et inversement.

Le gène *C9ORF72* se compose de 12 exons. Il existe trois résultats de transcriptions possibles pour ce gène. Deux d'entre eux permettent la traduction d'une protéine de 481 acides aminés, correspondant à la séquence nucléotidique des exons 2 à 11. En revanche, l'exon 1 est différent entre les deux transcrits. Dans l'un d'entre eux, il s'agira de l'exon 1a et dans l'autre de l'exon 1b. Ces deux exons ne sont pas codants et donc aboutissent à la même protéine. Il existe un dernier variant qui donne une protéine de 222 acides aminés. Le transcrit correspondant se compose des exons 2 à 5 pour la partie codante et de l'exon 1a. Contrairement à la plupart des autres gènes associés à la SLA ou la DFT, les mutations de *C9ORF72* ne sont pas ponctuelles mais correspondent à des répétitions d'un motif hexanucléotidique GGGGCC entre les exons 1a et 1b. Le nombre de ces répétitions oscille généralement entre 2 et 30 chez les individus sains mais peut monter à plusieurs centaines ou milliers chez les patients atteints de SAL et/ou de DFT.

Le rôle de *C9ORF72* est encore peu caractérisé. Cependant, on sait que la protéine est impliquée dans l'autophagie. En effet, *C9ORF72* se lie à ULK1, une protéine clé dans l'initiation de l'autophagie mais forme aussi un complexe avec SMRC8 et WDR41 qui catalyse l'activation de RAB39B, un marqueur de l'autophagosome (Sellier et al., 2016, Webster et al., 2016). *C9ORF72* colocalise également avec RAB5 et RAB7 et participe donc au processus d'endocytose (Farg et al., 2014).

Les études réalisées sur les mutants *C9ORF72* ont permis d'identifier trois mécanismes pathologiques (Figure 8):

-L'haploinsuffisance : il s'agirait là d'un mécanisme par perte de fonction. Gijssels et al ont montré que la quantité de deux des trois transcrits possibles de *C9ORF72* est réduite de moitié dans le cortex cérébral de patients porteurs d'un nombre pathologique de répétitions hexanucléotidiques (Gijssels et al., 2012). Une telle répression entraîne l'apparition de symptômes moteurs et une diminution de la longueur axonale chez le poisson zèbre (Ciura et al., 2013) ainsi qu'une dégénérescence précoce des motoneurones associée à une diminution de la biogénèse des lysosomes et à la formation d'agrégats de DPR (dipeptide related proteins) (Shi et al., 2018).

-La formation de foyers d'ARN (RNA foci) : La formation d'un ARNm de *C9ORF72* comportant un grand nombre de répétitions hexanucléotidiques induit la formation de foyers d'ARN intranucléaires entraînant le piégeage de protéines ribonucléiques. En plus de la présence d'agrégats dans le noyau se pose donc le problème de la diminution de l'activité de certaines protéines ribonucléiques, notamment hnRNPA3, impliquée dans le transport extranucléaire, l'épissage ou la stabilité des ARN et PUR $\alpha$  associée à la transcription (Gallia et al., 2000, He and Smith, 2009, Mori et al., 2013b, Xu et al., 2013).

-La formation de dipeptides GP, GA ou GR : les répétitions hexanucléotidiques étant situées dans un intron ne devraient, dans des conditions physiologiques, pas être traduites car éliminées lors de l'épissage. Cependant, dans certaines conditions pathologiques notamment les répétitions de motifs au sein de l'intron d'un ARN, des mécanismes alternatifs de traduction peuvent se mettre en place : ce qu'on appelle « Repeat non-ATG translation ». Chez les patients présentant un grand nombre de répétitions GGGGCC au niveau du gène *C9ORF72*, Mori et al ainsi que Ash et al ont mis en évidence une accumulation sous forme d'inclusions de protéines présentant de multiples peptides GA, GR et GP (Ash et al., 2013, Mori et al., 2013a). Ces dipeptides correspondent aux acides aminés résultant de la traduction des expansions hexanucléotidiques de *C9ORF72* en fonction du cadre de lecture (GGG-GCC= GA, GGG-CCG= GP, GGC-CGG=GR).

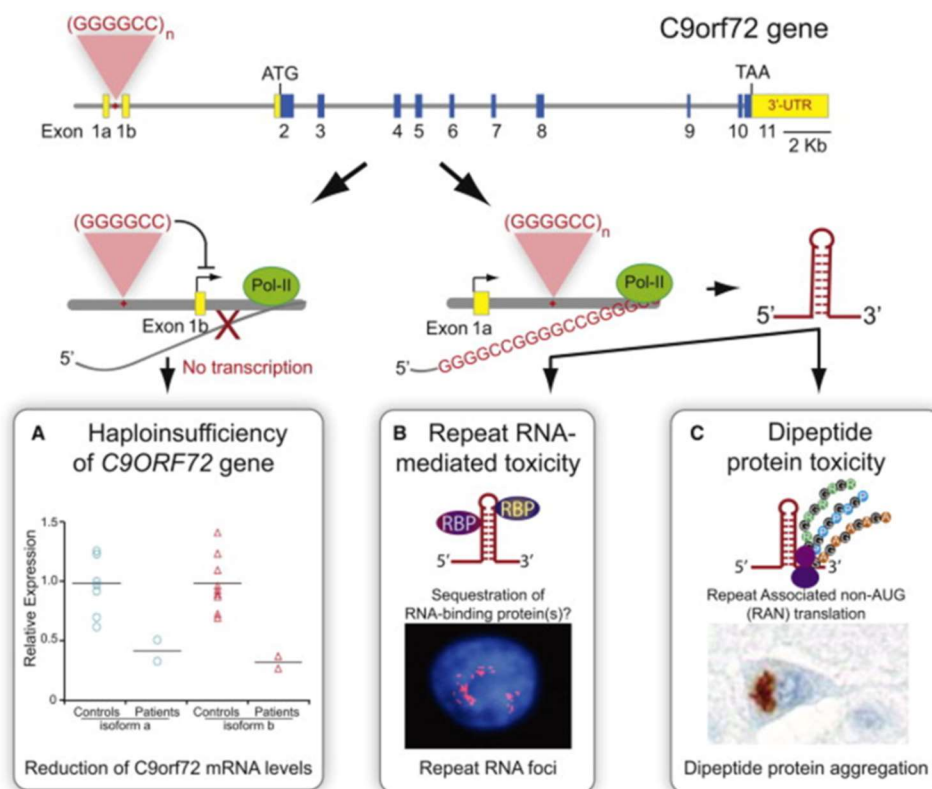


Figure 8 : Mécanismes hypothétiques associés au mutant *C9ORF72*

Les expansions GGGGCC entraînent une diminution de l'expression du gène (A), la formation de foyers d'ARN nucléaires (B) et la traduction du mutant indépendante du site ATG (C). Image tirée de (Ling et al., 2013).



- *TBK1*, *P62* et *OPTN* :

Ensemble, ces trois gènes représentent moins de 1% des cas de SLA ou de DFT. Ces trois gènes codent des protéines impliquées dans l'autophagie. *Tank binding kinase 1 (TBK1)* est une kinase dont les substrats sont impliqués dans plusieurs processus notamment l'autophagie et l'inflammation. Dans le processus autophagique, TBK1 phosphoryle certaines protéines comme P62 et OPTN, favorisant leur interaction avec l'ubiquitine et LC3 (Heo et al., 2015, Pilli et al., 2012, Richter et al., 2016). P62 et OPTN sont des adaptateurs protéiques composés d'un domaine LIR (LC3-interaction region) et d'un domaine UBA (Ubiquitin Binding Domain) leur permettant de faire la connexion entre l'autophagosome et les protéines cibles. Les altérations en lien avec ces gènes dans la SLA et la DFT sont principalement associées à l'autophagie, notamment lors de mutations au niveau des domaines LIR ou UBA des gènes *P62* et *OPTN* (Freischmidt et al., 2015, Goode et al., 2016, Shen et al., 2015).

#### D. Les autres gènes

Il existe des dizaines d'autres gènes impliqués dans l'une ou l'autre de ces pathologies ou communs à la SLA et la DFT. Ceux qui sont connus, répertoriés dans les tableaux ci-dessous, représentent chacun un très faible pourcentage dans la génétique de ces deux pathologies (Figure 9-10).

Gène	Protéine	Fonction	mutations	% des cas familiaux	% des cas sporadiques	Découvert en	Lié à la DFT?
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1	Superoxide dismutase	>150	20	2	1993	Non
<i>ALS2</i>	ALSIN2	Facteur d'échange de nucléotide guanine	>10	<1	<1	2001	Non
<i>DCTN1</i>	Dynactin	Composant du complexe moteur Dynéine	10	1	<1	2003	Non
<i>ANG</i>	Angiogenin	Ribonucléase	>10	<1	<1	2006	Non
<i>TARDBP</i>	TDP-43	protéine de liaison à l'ARN	>40	5	<1	2008	Oui
<i>FUS</i>	FUsed in Sarcoma	protéine de liaison à l'ARN	>40	5	<1	2009	Oui
<i>VCP</i>	Valosin-containing protein	Ségrégase de l'Ubiquitine	5	2	<1	2010	Oui
<i>OPTN</i>	Optineurin	Adaptateur de l'autophagie	1	4	<1	2010	Oui
<i>C9ORF72</i>	C9ORF72	Facteur d'échange de nucléotide guanine	Répétitions "GGGCC" intronique	25	10%	2011	Oui
<i>UBQLN2</i>	Ubiquilin 2	Adaptateur de l'autophagie	5	<1	<1	2011	Oui
<i>SQSTM1</i>	P62	Adaptateur de l'autophagie	10	<1	<1	2011	Oui
<i>PFN1</i>	Profilin 1	Protéine de liaison à l'Actine	5	<1	<1	2012	Non
<i>HNRNPA1</i>	hnRNPA1	protéine de liaison à l'ARN	3	<1	<1	2013	Oui
<i>MATR3</i>	Matrin 3	protéine de liaison à l'ARN	4	<1	<1	2014	Non
<i>TUBA4A</i>	Tubulin alpha 4a	Sous-unité des microtubules	7	<1	<1	2014	Oui
<i>CHCHD10</i>	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10	Protéine de la mitochondrie	2	<1	<1	2014	Oui
<i>TBK1</i>	TANK Binding Kinase 1	Régulateur de l'autophagie et de l'inflammation	10	<1	<1	2015	Oui
<i>C21ORF2</i>	C21ORF2	Participe à la réparation de l'ADN	>20	?	?	2016	Non
<i>MOBP</i>	Myelin associated Oligodendrocyte Basic Protein	Stabilise la gaine de myéline	?	?	?	2016	Oui
<i>SCFD1</i>	Sec1 Family Domain Containing 1	Participe à la fusion membranaire	?	?	?	2016	Non
<i>NEK1</i>	NIMA related Kinase 1	Senseur des dommages de l'ADN	1	?	?	2016	Oui
<i>KIF5A</i>	Kinesin Family member 5A	Moteur moléculaire	>10	<1	<1	2018	Non

Figure 9 : Génétique de la SLA

Image adaptée de (Taylor et al., 2016).

Gène	Protéine	Fonction	mutations	% des cas familiaux	% des cas sporadiques	Découvert en	Lié à la SLA?
<i>MAPT</i>	Microtubule associated protein tau	Protéine de liaison aux microtubules	53	15-20	3	1998	Non
<i>CHMP2B</i>	Charged multivesicular body protein 2B	Membre du complexe ESCRT-III lié à l'endocytose	12	<1	<1	2005	Oui
<i>PGRN</i>	Progranulin	Méiateur de l'inflammation	29	20	10	2008	Non
<i>PSEN1</i>	Presenil 1	Sous-unité de la gamma sécrétase	5	<1	<1	2006	Non
<i>PSEN2</i>	Presenil 2	Sous-unité de la gamma sécrétase	3	<1	<1	2009	Non
<i>C9ORF72</i>	C9ORF72	Facteur d'échange de nucléotide guanine	Répétitions "GGGCC" intronique	25	10%	2011	Oui

Figure 10 : Génétique de la DFT

### 3. Physiopathologie du syndrome SLA-DFT

Le syndrome SLA-DFT, en plus de ses composantes cliniques et génétiques, présente des aspects histologiques et cellulaires. En effet, la SLA et la DFT se caractérisent toutes deux par la mise en place d'une neuroinflammation ainsi que d'une perturbation de l'homéostasie protéique.

#### A. La neuroinflammation

Le terme neuroinflammation désigne l'activation des cellules immunitaires situées au niveau du système nerveux central (SNC) comportant les cellules microgliales et les astrocytes, une caractéristique histologique retrouvée chez tous les patients atteints de SLA et de DFT (Cagnin et al., 2004, Sjogren et al., 2004, Turner et al., 2004).

- **La microglie dans le syndrome SLA-DFT :**

Les cellules microgliales proviennent de cellules progénitrices issues du mésoderme qui colonisent le SNC durant l'embryogénèse. Il s'agit de la première ligne de défense contre les pathogènes au niveau du SNC. Ces cellules ont la particularité de s'autoréguler *via* la sécrétion de TGFβ1 et de renouveler d'elles même leur stock. Cependant, dans le cas d'une perte importante de cellules microgliales, des macrophages périphériques sont recrutés au niveau du SNC.

Les effets de la neuroinflammation sont encore actuellement controversés dans la SLA. En effet, le statut des microglies peut être de type « M1 » ou « M2 ». En fonction du statut des microglies, celles-ci vont sécréter ou non certains facteurs. Le statut M1 ou « activation classique » est considéré comme pro-inflammatoire et est généralement mis en place en réponse à une blessure ou à une infection. Ici, le rôle des cellules microgliales sera de détruire le pathogène *via* la libération de cytokines telles que l'IL-1β ou le TNFα ainsi que certaines espèces réactives de l'oxygène. D'un autre côté, la voie

alternative ou statut M2 correspond au processus inverse, anti-inflammatoire. Les cellules microgliales libèrent dans ce cas d'autres cytokines notamment l'IL-4, l'IL-13, le TGF $\beta$  et l'IL10, l'un des marqueurs anti-inflammatoires les mieux caractérisés (Zhu et al., 2015).

Les cellules de la microglie semblent au cours de la SLA modifier leur statut. En effet, chez des souris exprimant le mutant *SOD1*<sup>G39A</sup>, la microglie présente dans les premières semaines de développement de la pathologie un profil de type M2 avec une expression de gènes neuroprotecteurs comme *Ym1* ou *Bdnf* identique à des microglies sauvages. En revanche, lors de stades avancés de la pathologie, les cellules microgliales vont présenter une répression de *Bdnf* et *Ym1* et une forte induction de *Nox2*. Cependant des études du transcriptome de cellules microgliales et de macrophages spinaux de souris *SOD1*<sup>G93A</sup> semblent indiquer que le profil de la microglie est différent des profils M1 et M2 conventionnels. Ces profils seraient préférentiellement applicables aux macrophages environnants (Chiu et al., 2013). Les mécanismes pro-inflammatoires et neurodégénératifs passent par la voie de signalisation liée à *ApoE* et *Trem2* dont l'extinction restaure l'homéostasie de la microglie chez les souris *SOD1*<sup>G93A</sup> (Krasemann et al., 2017). Chez les patients atteints de DFT, la mutation de *CHMP2B*, *TREM2* ou *PGRN*, trois gènes causatifs de la DFT entraîne une hyperactivité microgliale (Clayton et al., 2017, Kleinberger et al., 2017, Krabbe et al., 2017) et l'extinction de *C9orf72* chez la souris provoque une augmentation de l'activité de la microglie par induction de *Il-1b* et de *Tnfa* (O'Rourke et al., 2016).

- **Les astrocytes dans le syndrome SLA-DFT :**

Les astrocytes participent au soutien des neurones en favorisant leur approvisionnement en nutriments et en limitant la toxicité du milieu extracellulaire notamment par un mécanisme de recapture du glutamate. Ce type cellulaire joue également un rôle important dans le développement et la progression de la SLA et la DFT. Pramatarova et al ont montré que l'expression du mutant *SOD1*<sup>G37R</sup> restreinte aux neurones n'entraînait pas leur dégénérescence (Pramatarova et al., 2001). Une seconde étude a montré que l'excision du mutant spécifiquement dans les astrocytes permettait un ralentissement de la progression de la maladie (Yamanaka et al., 2008). Il a également été montré que l'implantation d'astrocytes de patients SLA au niveau de la moelle épinière lombaire de souris sauvages entraînait l'atrophie des motoneurones spinaux, la formation d'inclusions protéiques dans ces mêmes neurones ainsi qu'une importante dénervation (Qian et al., 2017). Les astrocytes jouent également un rôle clé dans le développement de la DFT. Hallman et al ont étudié l'impact d'astrocytes exprimant le mutant *MAPT*<sup>N279K</sup> sur des neurones contrôles. En co-cultivant des astrocytes exprimant *MAPT*<sup>N279K</sup> dérivés d'iPS (induced pluripotent stem) de patients DFT avec des neurones contrôles également dérivés d'iPS, ils ont mis en évidence la dégénérescence des neurones contrôles *via* l'induction de marqueurs apoptotiques comme *CXCR4* (Hallmann et al., 2017).

## B. L'homéostasie protéique

### a. Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie protéique puisqu'il va permettre la synthèse des protéines, leur repliement, certaines modifications post-traductionnelles ou encore l'adressage de ces protéines nouvellement formées. Lorsqu'un stress cellulaire apparaît dans la cellule, par un afflux excessive au niveau du RE ou par l'accumulation de protéines mal conformées, un stress du RE (appelé également réponse aux protéines mal conformées, Unfolded Protein Response, UPR) s'installe (Schroder and Kaufman, 2005). Cette réponse consiste à augmenter la quantité de protéines chaperonnes, impliquées dans le dépliement et le repliement des protéines, à réduire la traduction des protéines afin d'éviter l'engorgement au niveau du RE ou encore à augmenter la taille du RE (Bravo et al., 2013). Si ce processus échoue à rétablir l'homéostasie protéique, une cascade d'activation de l'apoptose se met en place.

Cette réponse de stress a été mise en évidence au niveau de la moelle épinière de patients atteints de SLA avec une augmentation de la quantité de ATF6, IRE1 et PERK qui sont les trois marqueurs principaux de la réponse aux protéines mal conformées. De plus, dans le LCR de ces patients, il a été montré une augmentation de PDI, une protéine impliquée dans la dégradation des protéines mal conformées (Atkin et al., 2008). Par ailleurs, l'étude post-mortem de tissus de patients atteints de SLA a montré une augmentation au niveau spinal du nombre de cellules positives à CHOP un marqueur apoptotique conséquent à un stress du RE (Ito et al., 2009).

Dans le modèle murin *SOD1<sup>G93A</sup>*, des résultats similaires ont été obtenus, avec une induction au niveau des motoneurons spinaux de marqueurs de stress du RE comme *BIP* (*binding immunoglobulin protein*). De plus, l'utilisation d'un agent bloquant la réponse UPR, le salubrinal, permet un retard d'apparition des symptômes (diminution de la force musculaire) et une augmentation de la survie des souris (Saxena et al., 2009). Comme les patients SLA, les souris exprimant le mutant *SOD1<sup>G93A</sup>* présentent une augmentation du nombre de cellules positives à CHOP au niveau spinal (Ito et al., 2009). Des résultats similaires ont été observés au niveau du cerveau de souris exprimant le mutant *MAPT<sup>P301L</sup>* en lien avec la DFT et la maladie d'Alzheimer, avec une augmentation de la quantité de PERK et de eIF2A-P. Le traitement par un inhibiteur de PERK, impliqué dans la réponse UPR limite la neurodégénérescence (Radford et al., 2015).

L'ensemble de ces données semblent montrer que le stress du RE est néfaste dans les cas de SLA et de DFT, accélérant la neurodégénérescence et diminuant la survie.

### b. Inclusions protéiques

Chacun des constituants de la cellule présente une demi-vie plus ou moins longue et à terme, doit être dégradé afin de permettre la remobilisation de ses composants élémentaires. La dégradation des

protéines se fait par deux voies distinctes qui sont la voie protéasomale et la voie autophagique. L'une des caractéristiques principales de la SLA et de la DFT est la formation progressive d'inclusions protéiques intracellulaires, principalement dans les neurones (Blokhuys et al., 2013, Ferrari et al., 2011). Si ces agrégats sont universels dans ces deux maladies, leur nature peut varier en fonction de l'origine génétique du patient. Dans 97% des cas de SLA, les neurones des patients présentent des inclusions positives à TDP43 et à l'ubiquitine. Les derniers cas sont des inclusions positives à SOD1 (2%) ou FUS (1%). Concernant la DFT, les deux types d'inclusions majoritaires sont les inclusions positives à TDP43 (45%) ou à TAU (45%). Les autres patients présentent des inclusions positives à FUS (9%) ou des inclusions de type UPS (ubiquitin-proteasome system) qui sont des structures positives à P62 et à l'ubiquitine (Figure 11) (Ling et al., 2013).

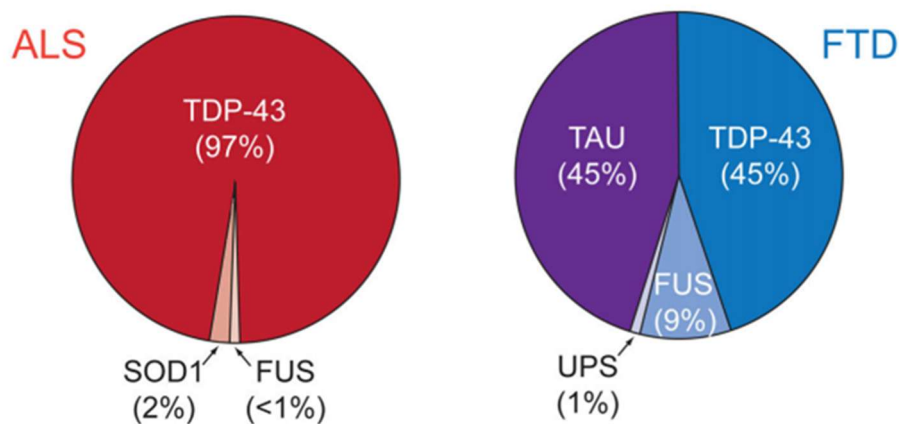


Figure 11 : Composante histopathologique du syndrome SLA-DFT

Dans 97% des cas de SLA et 45% des cas de DFT, les neurones des patients présentent des inclusions positives à TDP43. Les agrégats positifs à FUS sont également retrouvés dans des cas de SLA (1%) et de DFT (9%). Dans les derniers cas de SLA, les agrégats protéiques sont positifs à SOD1. 45% des cas de DFT sont associés à des inclusions de la protéine TAU. Enfin le seul gène associé aux inclusions de type UPS (positives à P62 et à l'ubiquitine) est *CHMP2B*. Image tirée de (Ling et al., 2013).

### c. Syndrome SLA-DFT : maladie de type prion ?

Ces inclusions représentent un véritable challenge dans la compréhension de ces deux maladies puisque des études ont mis en évidence la capacité de propagation d'une cellule à l'autre de ces agrégats protéiques comme dans les maladies de type prion. C'est le cas des agrégats formés par plusieurs mutants SOD1 qui sont sécrétés par le neurone et endocytés par les cellules avoisinantes par macropinocytose (Munch et al., 2011). Ces mutants qui forment des fibrilles semblent également capables, comme dans les maladies de type prion, de modifier la conformation des protéines SOD1 sauvages (Grad et al., 2011). D'autres mutations liées à la SLA présentent également ce profil de propagation de type prion, notamment les protéines TDP43 mutantes, libérées par les exosomes puis pris en charge par les cellules voisines (Nonaka et al., 2013) ou les protéines FUS mutantes (Nomura et al., 2014).

## II. Le processus autophagique dans le syndrome SLA-DFT

### 1. Le processus autophagique

L'autophagie est un processus cellulaire permettant le recyclage et la remobilisation des constituants élémentaires de la cellule comme les acides-aminés et les acides nucléiques. Il s'agit d'un processus mis en place très tôt dans l'évolution puisque l'ensemble des cellules eucaryotes l'utilisent.

#### A. Le lysosome

Dans sa forme la plus basique, l'autophagie ne fait intervenir qu'une seule structure qui est le lysosome ou lysosome primaire. Cet organite découvert en 1949 est un compartiment subcellulaire entouré d'une simple membrane phospholipidique. Il contient un grand nombre d'enzymes de différentes natures appelées hydrolases acides (protéases, lipases, nucléases) qui ont pour fonction de dégrader ou convertir des lipides, protéines et acides nucléiques. Une fois les molécules cibles dégradées, leurs constituants sont remobilisés dans le cytoplasme ou libérés dans le milieu extracellulaire par exocytose. La particularité du lysosome par rapport aux autres organites est son pH très bas, compris entre 4 et 5. Cette acidité est nécessaire au fonctionnement des hydrolases acides et permise par la présence de pompes à protons le long de la membrane. Ces pompes font entrer des ions hydrogènes par hydrolyse d'ATP. Il existe des maladies dans lesquelles certaines hydrolases acides sont inopérantes, conduisant à l'accumulation de matériel que la cellule est incapable de dégrader. C'est le cas de la maladie de Gaucher ou de la mucopolysaccharidose, qui conduisent respectivement à une splénomégalie et un retard développemental (Slaugenhaupt, 2002, Stirnemann et al., 2017).

Il existe plusieurs mécanismes d'acheminement des hydrolases acides vers le lysosome. Le mieux caractérisé passe par la voie « mannose-6-phosphate » (M6P). Dans cette voie, l'hydrolase acide est glycosylée à la sortie de sa traduction. Elle est ensuite dirigée vers l'appareil de Golgi au niveau duquel lui est greffé un phosphate au niveau du mannose précédemment ajouté. L'enzyme qui catalyse cette phosphorylation est codée par deux gènes : *GNPTAB* et *GNPTG*. Elle se compose de deux sous-unités alpha, deux sous-unités bêta (codées par *GNPTAB*) et deux sous-unités gamma (codées par *GNPTG*). Une fois ce groupement ajouté, l'hydrolase se lie à un récepteur au M6P (M6PR) ancré à la membrane de l'appareil de Golgi. Une partie de l'appareil de Golgi va bourgeonner sous la forme d'une vésicule entourée de clathrine et cette vésicule fusionnera par la suite avec l'endosome tardif, à l'intérieur duquel, le pH va déstabiliser la liaison entre le M6P et son récepteur. L'hydrolase acide n'est toutefois pas encore active. Elle ne le sera que lorsque l'endosome tardif fusionnera avec un lysosome (Figure 12) (Coutinho et al., 2012). Ce groupement M6P ne se retrouve que sur certaines hydrolases acides et n'a qu'une seule fonction : diriger les hydrolases acides vers le lysosome.

Il existe trois autres voies appelées M6P indépendantes. La première fait intervenir une famille composée de 5 récepteurs : sortilin, SorCS1, SorCS2, SorCS3 and SorLA. Ces récepteurs sont activés au niveau de l'appareil de Golgi suite à leur clivage par la furine (Munck Petersen et al., 1999). Une fois l'hydrolase acide liée à son récepteur, une partie de l'appareil de Golgi bourgeonne et se dirige vers l'endosome. Une troisième voie fait intervenir le récepteur LIMP-2 et permet l'adressage spécifique de la  $\beta$ -glucocérébrosidase. Contrairement aux deux autres voies, le récepteur LIMP-2 n'est pas recyclé et est retrouvé au niveau du lysosome (Reczek et al., 2007). Enfin, il existe une classe de protéines lysosomales ne dépendant d'aucun de ces récepteurs. Ces protéines présentent un motif YXXØ (Y correspond à une tyrosine, X à un acide-aminé quelconque et Ø correspond à un acide aminé hydrophobe). Il s'agit majoritairement des protéines membranaires de type LAMP. Leur transport fait intervenir des protéines adaptatrices nommées AP (numérotées de 1 à 4). Ce transport se fait vers l'endosome puis le lysosome (Brulke and Bonifacino, 2009). Ces 4 voies d'adressage protéique diffèrent par les hydrolases qu'elles prennent en charge mais aussi par la destination de la protéine en question. En effet, la voie associée à la sortiline est également impliquée dans l'exocytose de nombreuses protéines comme l'interféron gamma (Herda et al., 2012).

Les premières études sur le lysosome ont montré que cet organite était capable de dégrader du matériel cytoplasmique sans que celui-ci soit transporté jusqu'au lysosome. Pour ce faire, le lysosome va adopter une forme particulière, plus filiforme. Les extrémités du lysosome vont alors s'éloigner puis se rejoindre afin de former une sphère, englobant une partie du cytoplasme (Sakai et al., 1989). Le postulat de départ était que cette structure englobant une partie du cytoplasme correspondait à l'autophagolysosome (structure différente qui sera décrite plus en détail dans la partie « Macroautophagie ») (Sakai and Ogawa, 1982).



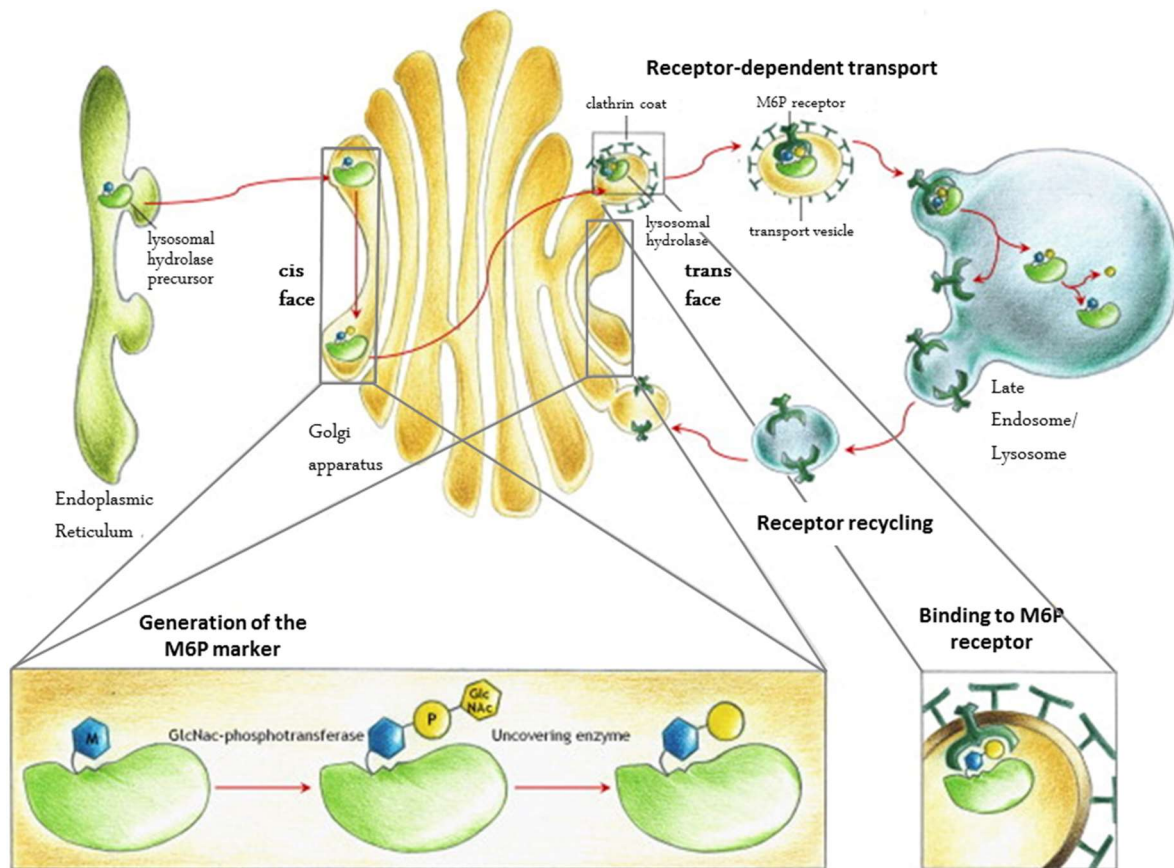


Figure 12 : Transport « M6P dépendant » des hydrolases acides vers le lysosome.

Les hydrolases acides sont synthétisées au niveau du RE puis leur est greffé un groupement mannose. Elles sont ensuite acheminées au niveau de l'appareil de Golgi où l'enzyme GlcNac-phosphotransférase (formée des sous-unités codées par *GNPTAB* et *GNPTG*) ajoute à ces protéines un phosphate au niveau du sucre préalablement greffé. Les hydrolases acides pourront alors se lier à un récepteur au M6P au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi. Cette partie de l'appareil de Golgi va bourgeonner puis fusionner avec un endosome tardif ou avec le lysosome. Le pH acide de deux structures entraîne la dissociation des hydrolases acides avec leur récepteur qui sera recyclé au niveau de l'appareil de Golgi. Image adaptée de (Coutinho et al., 2012).

## B. Les différentes formes d'autophagie

Il existe différents degrés de complexité du processus autophagique, progressivement mis en place chez les organismes les plus complexes. Aujourd'hui, on dénombre trois formes d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes (AMC) et enfin la macroautophagie (Figure 13).

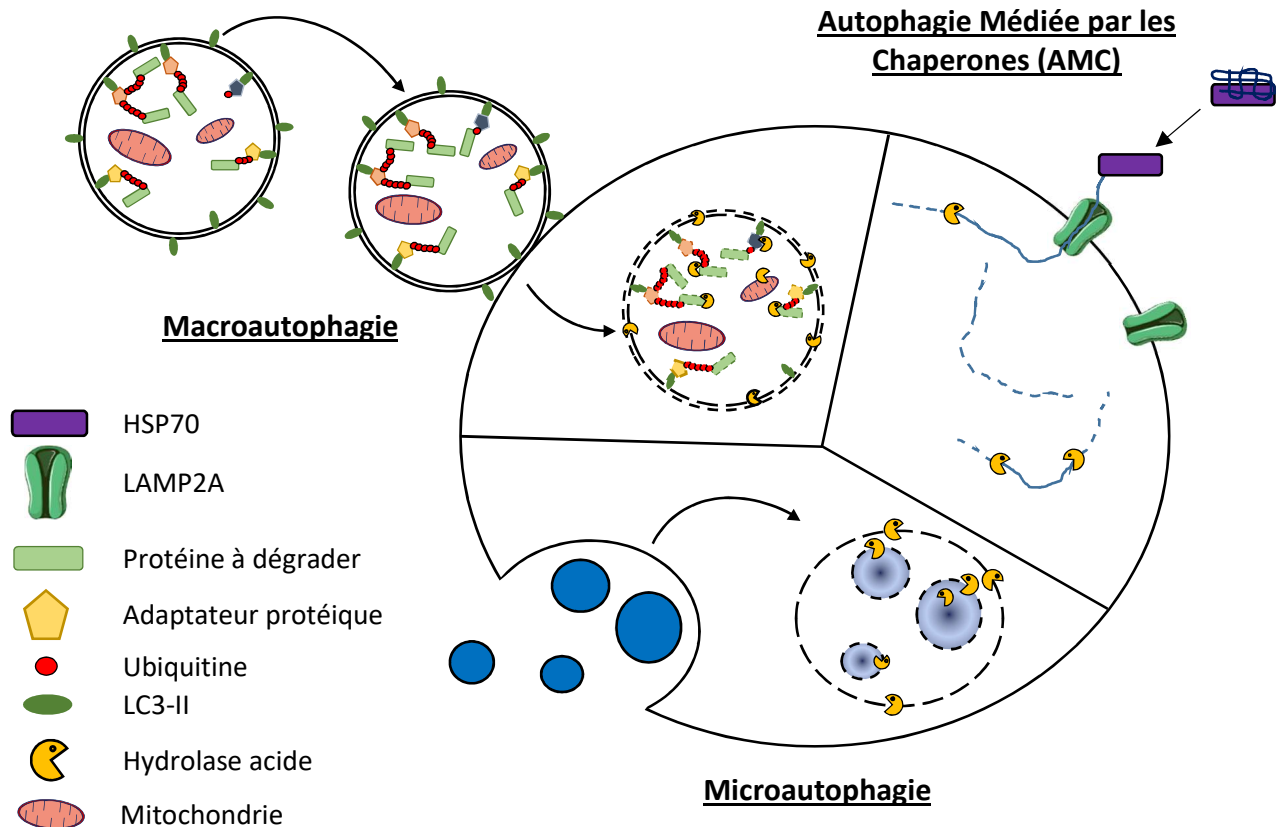


Figure 13 : Les différentes formes d'autophagie dans la cellule eucaryote

La microautophagie consiste en une simple internalisation de petites vésicules à l'intérieur du lysosome. L'AMC nécessite la protéine chaperonne HSP70 (ou Hsc70) qui achemine les protéines à dégrader jusqu'au lysosome où elle catalyse leur dépliement. Les protéines sont ensuite chargées à l'intérieur du lysosome par interaction avec LAMP2A. Dans la macroautophagie, les protéines à dégrader sont empaquetées dans une structure à double membrane, l'autophagosome qui fusionne ensuite avec le lysosome. Dans chacun des cas, les hydrolases acides du lysosome dégradent les protéines, lipides et acides nucléiques internalisés.

### a. La microautophagie.

Le terme microautophagie est apparu en 1966 et décrivait l'internalisation de petites vésicules cytoplasmiques à l'intérieur du lysosome (De Duve and Wattiaux, 1966). Cette forme d'autophagie permet la dégradation de constituants solubles intravésiculaires. Les vésicules sont prises en charge par le lysosome où leur contenu est dégradé (Marzella et al., 1980).

### b. L'autophagie médiée par les chaperones

Alors que la notion de non sélectivité dans l'autophagie était fortement ancrée dans les esprits, il a été montré qu'en présence de certains facteurs comme du sérum ou de l'insuline ou lors de modifications du milieu environnant (modifications de la température), toutes les protéines n'étaient pas également dégradées par le lysosome (Auteri et al., 1983). Par la suite, plusieurs études ont permis de mettre en évidence un motif pentapeptidique nécessaire et suffisant à la dégradation d'une protéine. Ce motif présent sur la protéine est reconnu par la protéine chaperonne HSP70 (Agarraberes and Dice, 2001, Backer and Dice, 1986, Chiang et al., 1989). Une fois le motif reconnu et lié à cette protéine, HSP70 va diriger la protéine à dégrader vers le lysosome au niveau duquel cette dernière interagira avec LAMP2A, une protéine associée à la membrane du lysosome (Cuervo and Dice, 1996). LAMP2A va alors recruter d'autres protéines homologues qui permettront la translocation de la protéine portant le motif pentapeptidique à l'intérieur du lysosome, une fois cette dernière linéarisée par HSP70 (Bandyopadhyay et al., 2008). Cette voie de dégradation par le lysosome a été nommée AMC de par les acteurs protéiques qu'elle fait intervenir (Figure 13). En plus de son rôle évident dans le renouvellement protéique dans la cellule, l'AMC est également impliquée dans le contrôle de la qualité des protéines. Les chaperones HSP70 peuvent prendre en charge les protéines mal conformées, oxydées ou présentant un profil anormal (*via* une modification post traductionnelle anormale). En effet, l'AMC a été montré comme induite lors de situations de stress comme le stress oxydatif ou l'hypoxie (Dohi et al., 2012, Kiffin et al., 2004).

### c. La macroautophagie

La macroautophagie est la forme la plus complexe d'autophagie, faisant intervenir plus d'une centaine de protéines notamment la famille des protéines ATG (autophagy-related protein) (plus de 30 différentes). Du fait de sa très large participation au processus autophagique, de nombreuses études l'apparentent au processus autophagique dans son ensemble. Contrairement aux deux autres formes minoritaires, la macroautophagie fait intervenir une structure supplémentaire au lysosome : l'autophagosome. Cet autophagosome qui n'est au départ qu'un phagophore, c'est-à-dire une structure linéaire à double membrane, va croître et se circulariser. Il contiendra alors l'ensemble des constituants à dégrader. Lors de l'étape finale, l'autophagosome fusionne avec un lysosome pour former l'autolysosome. Le contenu de cette structure finale sera dégradé par l'action des hydrolases acides. Ainsi, la macroautophagie se découpe en plusieurs étapes (initiation, élongation et fusion) détaillées dans la figure 14.

- Origine du phagophore :

L'origine de cette structure est encore mal comprise. Des études ont montré que la double membrane du phagophore pourrait provenir du RE (Yla-Anttila et al., 2009), de l'appareil de Golgi (Yen et al., 2010), de la mitochondrie (Hailey et al., 2010) ou encore de la membrane plasmique (Ravikumar et al.,

2010). Il semblerait qu'en fonction des conditions environnantes à la cellule, celle-ci puise dans les réserves lipidiques de différents organites afin de former le phagophore (Figure 14).

- L'initiation

L'initiation de l'autophagie fait intervenir un complexe majeur appelé ULK au niveau de la structure pré-autophagosomale. Ce complexe se compose des protéines ULK1, FIP200, ATG101 et ATG13. Ce dernier se lie à la fois à ULK1, FIP200 et à ATG101. Chacune de ces protéines possède de nombreux sites de phosphorylation qui vont permettre son activation ou son inhibition. L'initiation de l'autophagie nécessite l'ensemble de ces 4 acteurs (Ganley et al., 2009, Mercer et al., 2009). ULK1 est une sérine/thréonine kinase importante dans le processus autophagique puisque son extinction réduit considérablement le nombre d'autophagosomes formés (Chan et al., 2007, McAlpine et al., 2013). De plus, l'activation par phosphorylation de ULK1 va lui permettre de s'autophosphoryler et de phosphoryler FIP200 et ATG13, permettant leur activation (Bach et al., 2011, Hosokawa et al., 2009, Jung et al., 2009). Cette activation de ULK1 va dépendre de deux régulateurs agissant en amont qui sont AMPK (AMP-activated protein kinase) (inducteur) et mTOR (mammalian target of rapamycin) (répresseur) (Kim et al., 2011) (Figure 14).

A noter toutefois qu'une étude a montré, dans des lymphoblastes de poulet que l'extinction de *Ulk1* et *Ulk2* n'avait pas d'effet sur le processus autophagique. En revanche, l'extinction de *Atg13* entraînait une forte diminution du nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes, mettant en relief le rôle prépondérant de cette protéine dans l'initiation de l'autophagie. Ces données soulèvent également l'hypothèse d'une voie de l'autophagie indépendante de ULK1 ou de la présence d'autres kinases pouvant activer ATG13 et FIP200 (Akers et al., 2011).

- La nucléation

L'étape de nucléation correspond au recrutement d'autres facteurs menant à la formation de l'autophagosome. Cette étape permet la formation du complexe beclin/PI3K (phosphatidylinositol 3 phosphate kinase) au niveau de la membrane du phagophore. Ce complexe se compose des protéines beclin, VPS34 (ou PI3K), ATG14, P150, et AMBRA1. En absence d'activation du processus autophagique, beclin se trouve dans le cytoplasme sous une forme inactive de par sa liaison à BCL2. C'est UVRAG, dont l'induction stimule l'autophagie, qui permet son recrutement (Liang et al., 2006). La protéine endothelin b1 joue également un rôle dans cette étape en favorisant le recrutement de beclin par UVRAG. Ensuite, ATG14 entre en compétition avec UVRAG pour se lier à beclin. L'incorporation de ATG14 au complexe est indispensable à la formation d'autophagosomes, tout comme celle de VPS34 qui permettra l'ancrage du complexe à la membrane du phagophore (Itakura et al., 2008). Il semblerait également que la protéine endothelin b1 (BIF1) participe à cette étape de nucléation en permettant la courbure de la membrane du phagophore (Masuda et al., 2006, Takahashi et al., 2007). La fonction de P150, une sérine/thréonine kinase n'est pas encore complètement élucidée bien qu'il ait été montré que sa déplétion bloque l'initiation de l'autophagie chez la drosophile

(Lindmo et al., 2008) ou induit une accumulation de vacuoles autophagiques dans un modèle murin (Nemazanyy et al., 2013). Il semblerait que P150 favorise l'activation de VPS34 (Stjepanovic et al., 2017). AMBRA, le dernier membre du complexe beclin/PI3K, se lie également à beclin et promeut son recrutement lors du processus autophagique. Sa déplétion est à l'origine d'une répression de l'autophagie et peut conduire à l'apoptose (Fimia et al., 2007, Gu et al., 2014). Rubicon quant à lui régule négativement l'autophagie en se liant à beclin (Tanaka et al., 2016, Zhong et al., 2009) (Figure 14).

- L'élongation

Durant l'étape suivante, l'élongation, d'autres facteurs sont recrutés afin d'étendre la membrane du phagophore et de la circulariser, formant l'autophagosome. Cet autophagosome contiendra alors les protéines, acides nucléiques et organites qui seront par la suite dégradés.

ATG7 et ATG10 jouent un rôle en catalysant la formation du dimère ATG5-ATG12 auquel se greffera par la suite ATG16L (Kuma et al., 2002). La protéine P300 régule négativement l'activité de ce complexe essentiel à l'autophagie par acétylation de ATG5 et ATG12 (Lee and Finkel, 2009). Le second système apparenté à ce processus est appelé « ubiquitin-like » puisqu'il se compose d'enzyme qui vont, comme dans le système du protéasome se recruter les unes à la suite des autres afin d'ajouter un groupement phosphatidyléthanolamine (PE) à la protéine LC3 (ATG8). LC3 est communément utilisé comme marqueur des autophagosomes car une fois ce groupement PE ajouté, LC3 va s'intégrer à la membrane interne ou externe de l'autophagosome. Cet ajout passe par plusieurs interactions protéiques. Tout d'abord, l'enzyme « E1-like » ATG7 se lie à LC3 et favorise le recrutement de ATG4 (E2-like) qui interagit alors à son tour avec LC3 (Ichimura et al., 2000). Enfin ATG4 et le complexe ATG5-7-16L catalysent l'ajout du groupement PE sur la protéine LC3 permettant ainsi son ancrage à la membrane de l'autophagosome en formation (Fujita et al., 2008, Hanada et al., 2007). Cette réaction de lipidation peut être reversée par ATG4 (Kirisako et al., 2000) (Figure 14).

- Maturation et fusion

Une fois l'autophagosome formé, l'étape suivante est la fusion avec le lysosome afin de former un autolysosome. Les hydrolases acides contenues dans le lysosome pourront alors dégrader le matériel intra-autophagosomal.

Les systèmes fongique et mammifère divergent dans les mécanismes de fusion entre ces vésicules. En effet, une étude a montré dans plusieurs souches de levures que l'activité autophagique n'était pas perturbée par un traitement au nocodazole, un composé de dépolymérisation des microtubules (Kirisako et al., 1999) alors qu'un traitement de même type sur des cellules humaines provoque une accumulation d'autophagosomes et un blocage de la fusion avec les lysosomes (Aplin et al., 1992, Kochl et al., 2006). Dans les cellules de mammifères, il semblerait que les autophagosomes, répartis de façon homogène dans la cellule utilisent les microtubules afin de rejoindre les lysosomes groupés

au niveau du centre organisateur des microtubules. Ce constat serait cohérent avec l'implication de la dynéine dans ce trafic rétrograde (Jahreiss et al., 2008, Ravikumar et al., 2005). L'interaction entre les autophagosomes et la dynéine se fait par l'intermédiaire de LC3 et JNK1 (Fu et al., 2014) (Figure 14).

La fusion entre l'autophagosome et le lysosome nécessite l'interaction de plusieurs acteurs protéiques répartis sur la surface des deux structures. RAB7 a été en premier lieu localisée sur les endosomes tardifs. Cependant, des études récentes ont montré que le complexe MON1-CCZ1, recruté par interaction avec LC3, permettait l'ancrage de la protéine RAB7 au niveau des autophagosomes (Gao et al., 2018). RAB7 permet alors le recrutement du complexe HOPS (homotypic fusion and protein sorting) qui relie l'autophagosome au lysosome. D'autres acteurs protéiques appelés SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) participent également à cette étape. Ce sont des récepteurs localisés à la surface des vésicules qui interviennent dans les événements de fusion intervésiculaires. La syntaxine 17 (STX17), une protéine SNARE localisée à la surface des autophagosomes est par exemple capable de se lier à VAMP8, une protéine de surface lysosomale (Itakura et al., 2012, Jiang et al., 2014) (Figure 14).

En plus de ces facteurs essentiels, on dénombre un certain nombre de protéines auxiliaires qui favorisent la fusion des deux structures par l'augmentation du nombre de points d'ancrage entre les deux membranes. PLEKHM1 est présente au niveau de la membrane des lysosomes et recrute le complexe HOPS (McEwan et al., 2015). La protéine EPG5 (ectopic p-granules autophagy protein 5 homolog) participe également à ce processus de fusion. Localisée au niveau de la membrane des lysosomes par liaison à VAMP8 ou RAB7, EPG5 peut interagir avec LC3 mais catalyse aussi la formation et la stabilité des complexes SNARE, notamment le complexe STX17-SNAP29-VAMP8 (Wang Z et al., 2016). Enfin, la protéine de surface lysosomale TECPR1 peut se lier au complexe ATG5-ATG12 (amputé de Atg16L) afin de former un pont supplémentaire entre les deux structures (Chen et al., 2012).

#### d. Macroautophagie sélective et non sélective.

Longtemps la question de la sélectivité de l'autophagie a été posée. S'agit-il d'un processus ciblé ou visant simplement à générer un nouveau stock de constituants cellulaires ? Aujourd'hui, la réponse qui semble se détacher des centaines d'études dirigées sur le sujet est que l'autophagie peut être sélective ou non. En fonction de son environnement interne ou externe, la cellule va s'orienter vers un mécanisme plutôt sélectif ou aléatoire. L'autophagie non sélective, en particulier dans la macroautophagie va entraîner le piégeage d'une partie aléatoire du cytoplasme. En revanche, dans le cas contraire, de nombreux signaux sous la forme d'étiquetage vont être disséminés dans la cellule afin de regrouper à l'intérieur de l'autophagosome en formation un maximum de matériel voué à la dégradation. L'un des moyens les plus connus, utilisé également lors de la dégradation par le protéasome, est le marquage à l'ubiquitine. Ce procédé passe par plusieurs enzymes nommées E1

(enzyme d'activation), E2 (enzyme de conjugaison) et E3 (enzyme de ligature) qui vont agir en synergie afin de greffer un ou plusieurs groupements ubiquitine aux protéines qui doivent être dégradées (Myung et al., 2001). La cellule fait ensuite appel à des adaptateurs protéiques comme P62 ou OPTN (optineurine). Le rôle de ces protéines sera d'assurer la liaison entre LC3 et les protéines à dégrader grâce à deux domaines primordiaux : LIR et UBA. Le domaine LIR (LC3-interacting region) est un domaine de liaison à LC3 et UBA (ubiquitin associated domain) est un domaine de liaison à l'ubiquitine (Kim et al., 2016). Ainsi en se liant aux protéines LC3 ancrées à la membrane interne de l'autophagosome, ces adaptateurs vont permettre l'acheminement des protéines à dégrader (marquées à l'ubiquitine) à l'intérieur de l'autophagosome (Figure 14). De plus, ces adaptateurs comme P62 interagissent avec des moteurs moléculaires comme la dynéine permettant leur trafic le long des microtubules (Calderilla-Barbosa et al., 2014). A noter toutefois que l'ubiquitination joue également un rôle dans d'autres processus cellulaires comme la réponse immunitaire et la réparation de l'ADN (Hu and Sun, 2016, Ulrich and Walden, 2010).

Les protéines ne sont pas les seules à être ciblées lors de l'autophagie. En effet, certains organites, lorsqu'ils sont endommagés ou en surnombre peuvent être marqués afin d'être dégradés. C'est principalement le cas des mitochondries et des peroxysomes. Lors du processus d'autophagie sélective, on ne parle pas d'autophagosomes mais de vésicules Cvt (cytoplasm-to-vacuole targeting). Dans cette situation, la vésicule autophagique présente deux caractéristiques. Tout d'abord, sa taille est moins importante puisque ce n'est pas à elle de récolter les constituants cellulaires, ce sont ces derniers qui viennent à elle *via* les adaptateurs protéiques. Deuxièmement, en plus de son contenu protéique habituel, la vésicule contient également des hydrolases acides qui sont recrutées sous la forme de précurseurs comme les aminopeptidases 1 et 4 ou l'alpha-mannosidase (Scott et al., 1997).

La mitophagie est une forme d'autophagie sélective passant par la présence du marqueur ATG2 au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et qui va directement se lier à LC3 (Kanki et al., 2009a, Okamoto et al., 2009). Il existe d'autres marqueurs de la mitophagie comme ATG33 (Kanki et al., 2009b) ou NIX (Novak et al., 2010). La dégradation d'autres organites tels que le peroxysome se déroule par des mécanismes proches, avec un récepteur de surface comme PEX14P qui interagit avec LC3 (Hara-Kuge and Fujiki, 2008). L'ubiquitine joue encore une fois un rôle en marquant les organites à dégrader (Kim et al., 2008).

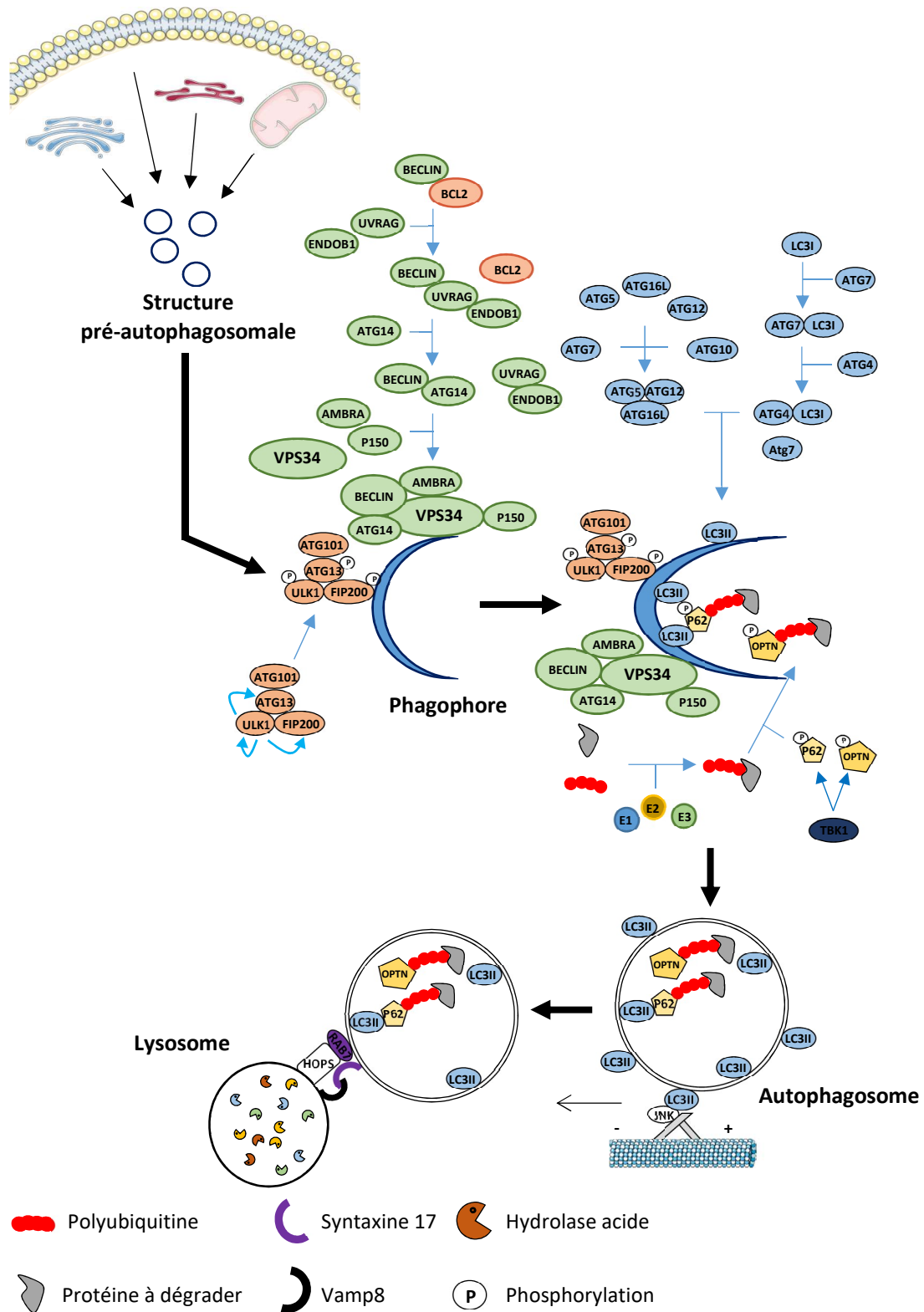


Figure 14 : Mécanismes de la macroautophagie

Le pré-autophagosome peut être formé à partir de la membrane de différentes structures comme la mitochondrie ou le RE. Durant l'étape d'initiation, le complexe ULK est formé et permet la formation du phagophore. Ensuite, la nucléation fait intervenir le complexe protéique PI3K/beclin qui favorisera et dirigera la croissance du phagophore. Durant l'étape d'élongation, un ensemble de protéines ATG vont permettre l'ajout d'un groupe phosphatidyléthanolamine (PE) sur la protéine LC3 qui pourra



alors s'ancrer à la membrane du phagophore. Le phagophore circularisé est ensuite nommé autophagosome. Parallèlement à cette étape d'élongation, des protéines adaptatrices comme P62 ou OPTN vont se lier à des protéines marquées à l'ubiquitine. Elles vont ensuite les acheminer jusqu'à l'autophagosome en formation en interagissant avec des moteurs moléculaires comme la dynéine et finalement se lieront à la protéine LC3. Une fois l'autophagosome formé, il sera dirigé par transport rétrograde vers le centre de la cellule où il fusionnera avec un lysosome pour former un autolysosome. Les hydrolases acides contenues dans le lysosome permettront la dégradation du contenu de l'autophagosome qui sera par la suite libéré dans la cellule ou dans le milieu extracellulaire par exocytose.

#### e. Autophagie et endocytose

Les mécanismes d'autophagie et d'endocytose sont étroitement liés. En effet, lors du processus autophagique, il arrive que l'autophagosome ne fusionne pas directement avec un lysosome mais avec un endosome tardif, formant une structure nommée amphisome. Cet amphisome fusionne par la suite avec un lysosome afin que son contenu soit dégradé. Les mécanismes dirigeant l'autophagosome préférentiellement vers l'endosome tardif ou vers le lysosome sont encore méconnus, malgré les évidences d'une connexion. Ainsi, autophagie et endocytose sont deux voies de convergence du recyclage des constituants environnants, l'autophagie se focalisant sur le matériel intracellulaire et l'endocytose sur le matériel membranaire ou extracellulaire. Les acteurs protéiques mis en jeu lors de la fusion entre l'autophagosome et l'endosome tardif sont essentiellement les mêmes que ceux nécessaires à la fusion avec le lysosome.

### C. Les régulateurs de l'autophagie

#### a. Régulateurs endogènes

- Statut nutritionnel de la cellule

On sait depuis de nombreuses années qu'une déprivation en nutriment induit de manière importante le processus autophagique. Cette méthode d'induction de l'autophagie est l'une des plus couramment utilisée *in vitro* car elle se base sur une réponse physiologique et relativement peu stressante. Les deux principaux régulateurs de l'autophagie dans la cellule sont mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) et l'AMPK (AMP-activated protein kinase). mTOR appartient à un complexe protéique impliqué dans la biogénèse des ribosomes et dans la traduction. Elle stimule la croissance et inhibe l'autophagie. Cette modulation de l'autophagie passe par l'activité de certains transporteurs d'acides aminés qui font entrer dans la cellule de la leucine (Nicklin et al., 2009).

AMPK et mTOR sont deux kinases agissant directement sur ULK1. En présence d'une forte concentration en glucose ou en nutriments, l'AMPK va être inhibé et mTOR va phosphoryler ULK1 au niveau de la sérine 757 ce qui bloquera son activité dans l'autophagie. mTOR inhibe également l'autophagie en agissant par le biais d'autres protéines. Une étude a montré que le blocage de mTOR entraînait une répression de TAP42 et PP2A, deux protéines régulant négativement l'activité de ULK1

(Yorimitsu et al., 2009). En revanche, lors d'une déprivation en nutriment, l'AMPK sera active et phosphorylera ULK1 au niveau des sérines 317 et 777. De plus, par le biais de TSC1/2, l'AMPK inhibera RHEB, un facteur activateur de mTOR (Kim et al., 2011, Long et al., 2005) (Figure 15).

Une seconde voie de répression de l'autophagie passe par la protéine kinase A (PKA). En effet, l'utilisation d'un mutant constitutivement actif de la PKA entraîne une importante répression de l'autophagie par phosphorylation inhibitrice de ULK1, entraînant son défaut de recrutement au niveau de la structure pré-autophagosomale (Budovskaya et al., 2005, Budovskaya et al., 2004) (Figure 15).

En plus des nutriments, l'insuline a également un effet négatif sur l'autophagie en empruntant la voie dépendante de l'AMPK et de mTOR. En effet, la liaison de l'insuline à son récepteur entraîne le recrutement de PTDINSK de classe I et la formation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Cela permet le recrutement et l'activation de AKT (Stokoe et al., 1997). Ce dernier va, par phosphorylation, inactiver le complexe TSC1/2 qui ne pourra alors pas bloquer RHEB, décrit plus tôt comme un activateur de mTOR (Inoki et al., 2002, Long et al., 2005, Manning et al., 2002) (Figure 15).

- Réponse UPR

La réponse UPR est une réaction physiologique de la cellule à une perturbation de la qualité des protéines, que ce soit une accumulation d'agrégats ou un défaut de repliement des protéines. Concernant l'homéostasie protéique, cette réponse impacte le processus autophagique de différentes manières.

Les trois marqueurs du contrôle de l'homéostasie protéique sont ATF6, IRE1 et PERK. Dans des conditions physiologiques, ces trois protéines sont peu exprimées ou inactives. Lors de l'activation de IRE1, ce récepteur se dimérise et s'autophosphoryle. Des études ont montré que cela lui permet de cliver l'ARNm du transcrit *Xbp1* qui sera transloqué dans le noyau où il activera la transcription de gènes associés à la réponse UPR (Ron and Walter, 2007). De plus, dans des modèles de SLA et de maladie de Huntington, *Xbp1* réprime le processus autophagique dans les neurones et inhibe la clairance des agrégats protéiques (Hetz et al., 2009, Vidal et al., 2012).

En revanche pour contrebalancer ces données, il a été mis en évidence le caractère essentiel de *Xbp1* dans l'induction de l'autophagie par la voie UPR. En effet, la répression de *Xbp1* entraîne une diminution de la formation d'autophagosomes (Kishino et al., 2017). Le récepteur IRE1 est également impliqué dans la formation des autophagosomes *via* l'activation de JNK (Ogata et al., 2006) qui favorise alors l'activation de beclin par phosphorylation de BCL2 (Lei and Davis, 2003). De plus, l'activation de ATF6, un autre membre du trio de la réponse UPR entraîne l'induction de HSPA5, un activateur de AMPK et TSC1/2, donc un inducteur de l'autophagie (Baumeister et al., 2005, Cook and Clarke, 2012).

Enfin, si l'augmentation de la quantité de PERK est à l'origine d'une induction du processus autophagique par conversion de la protéine LC3 (Kouroku et al., 2007), il entraîne également la

dissociation du complexe NRF2/KEAP1 et l'activation de NRF2 (Cullinan et al., 2003). Bien que le rôle principal de NRF2 soit lié aux voies de survie cellulaire, une étude a montré qu'il pouvait également avoir un rôle négatif dans l'autophagie (Rao et al., 2010).

Le rôle de la réponse UPR semble donc ambivalent dans l'autophagie, à la fois inducteur et répresseur. Néanmoins, l'ensemble des études traitant de ce sujet se basent sur des approches très différentes les unes des autres (Figure 15).

- Immunité

L'autophagie est également fortement induite dans les cellules de type macrophage lors d'une infection bactérienne ou suite à l'apoptose de cellules environnantes. Certains marqueurs de l'immunité ont été montrés comme inducteur de l'autophagie dans ces cellules immunitaires. C'est le cas de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) (Gutierrez et al., 2004), de IRGM (Immunity Related GTPase M) (Singh et al., 2006) ou encore de MYD88 (Shi and Kehrl, 2008) (Figure 15).

#### b. Régulateurs pharmacologiques

Aujourd'hui de nombreuses molécules sont connues pour induire ou réprimer l'autophagie. Les agents pharmacologiques les plus couramment utilisés sont d'origine bactérienne. Relativement bien caractérisés, ils permettent l'induction ou la répression de différentes étapes du processus autophagique.

- Les inducteurs

Parmi les inducteurs de l'autophagie, on trouve la rapamycine. Isolée de la souche *Streptomyces hygroscopicus*, cette molécule est un inhibiteur de la protéine mTOR (Figure 15). Dans les modèles de maladie de Parkinson, la rapamycine favorise la clairance des agrégats d'alpha-synucléine (Crews et al., 2010) et améliore le comportement moteur (Santini et al., 2009). En revanche, concernant la maladie d'Alzheimer et la SLA, les résultats sont plus hétérogènes. Certains modèles de maladie d'Alzheimer présentent, en réponse à un traitement à la rapamycine, une réduction des troubles cognitifs et une clairance des inclusions  $\beta$ -amyloïdes (Spilman et al., 2010) alors que d'autres présentent une accumulation de plaques  $\beta$ -amyloïdes (Zhang et al., 2010) ou une diminution de la survie (Ling et al., 2009). Dans la SLA, seules deux études ont été menées sur des souris SOD1<sup>G93A</sup>. Dans la première, le traitement est néfaste à la survie des animaux alors que dans l'autre (dans laquelle les souris sont dépourvues de lymphocytes matures), on observe un léger effet bénéfique de la rapamycine sur la survie (Staats et al., 2013).

La metformine est également un inducteur de l'autophagie couramment utilisé *in vitro* ou *in vivo* dans le cadre de traitement de maladies neurodégénératives. Il s'agit d'ailleurs d'un composé prescrit dans certains cas de diabète de type 2. Son rôle dans l'autophagie semble passer par l'activation de l'AMPK, le pendant de mTOR (Zhou et al., 2001) (Figure 15). Comme pour la rapamycine les traitements à la

metformine sur des modèles murins de maladie d'Alzheimer donnent des résultats très différents d'une étude à l'autre avec une amélioration de la clairance des agrégats et de la mémoire (Chen et al., 2016) ou une neurotoxicité accompagnée de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Picone et al., 2015). Dans l'optique d'un traitement de la SLA, une seule étude a été réalisée sur un modèle murin (SOD1<sup>G93A</sup>). Les conclusions ont été une absence d'effet du traitement sur l'apparition des symptômes ou la survie entre les groupes traités et placebo et un effet néfaste de la metformine sur la survie des souris femelles (Kaneb et al., 2011).

- Les répresseurs

La wortmannine est un inhibiteur de l'autophagie découvert chez *Penicillium funiculosum*. Elle agit directement sur ce processus en se liant de manière covalente à la PI3 kinase de classe III et en prévenant la formation de PtdInsP3 (Blommaert et al., 1997) (Figure 15). Cet inhibiteur intervient dans l'étape de nucléation de l'autophagie. La wortmannine n'a à l'heure actuelle jamais été utilisée comme traitement dans des modèles de SLA puisque la stratégie dans cette maladie serait plutôt d'induire la clairance des agrégats par l'autophagie. En revanche, l'inhibition de la PI3K a eu des effets positifs sur des modèles de maladie d'Alzheimer avec notamment une diminution de la quantité de plaques  $\beta$ -amyloïdes et une atténuation des troubles de la mémoire (Chiang et al., 2010, Haugabook et al., 2001, Petanceska and Gandy, 1999).

Le mécanisme d'action de la chloroquine dans l'inhibition de l'autophagie n'est pas encore complètement élucidé. Les premières études mettaient en évidence une accumulation de structures à simple ou double membrane denses aux électrons dans des parasites murins (Macomber and Sprinz, 1967). Par la suite, il a été mis en évidence le tropisme lysosomal de la chloroquine et son effet délétère sur la dégradation lysosomale. Une étude récente a également montré un blocage de la fusion entre autophagosome et lysosome suite à un traitement à la chloroquine (Figure 15) (Mauthe et al., 2018).

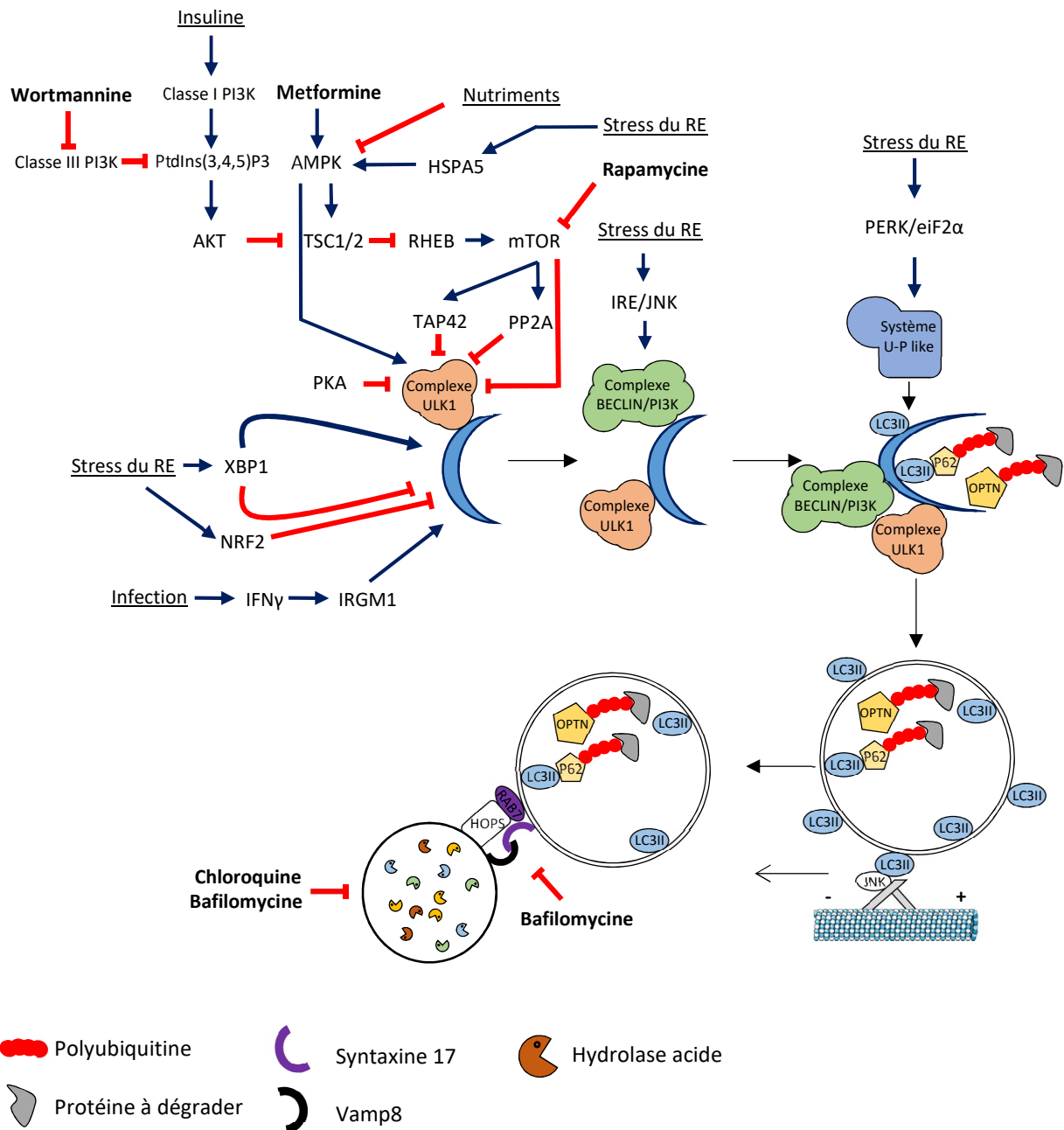


Figure 15 : Régulation endogène ou pharmacologique de la macroautophagie

Les noms en gras représentent des modulateurs pharmacologiques alors que ceux soulignés correspondent à des modulateurs endogènes (processus ou protéine). Les flèches bleues correspondent à des mécanismes d'induction alors que les rouges correspondent à des mécanismes d'inhibition. U-P : ubiquitine-protéasome.

## 2. Autophagie et syndrome SLA-DFT

L'autophagie est l'un des mécanismes qui a été le plus étudié dans la SLA et la DFT puisque comme dans de nombreuses maladies neurodégénératives, les neurones des patients présentent une accumulation progressive d'inclusions protéiques pathologiques. L'autophagie, et plus particulièrement la macroautophagie est le seul mécanisme capable de prendre en charge ces structures et de les éliminer. L'autophagie s'avère être un mécanisme d'autant plus pertinent dans la SLA et la DFT lorsque l'on s'intéresse aux gènes causatifs de ces deux pathologies. En effet, plus de la moitié de ces gènes sont impliqués dans l'homéostasie protéique ou directement dans le processus autophagique. Cependant, les modèles d'études nous ont montré que les différentes mutations en lien avec la SLA et la DFT peuvent avoir des impacts très différents sur le processus autophagique (Figure 16).

### A. Modulateurs directs

La protéine SOD1, comme d'autres antioxydants réprime le processus autophagique (Chen et al., 2009, Underwood et al., 2010). Cependant, les mutations de ce gène en lien avec la SLA montrent pour la plupart une exacerbation de l'autophagie et une accumulation de vacuoles autophagiques (Li et al., 2008, Wei, 2014). En revanche, ce qui est moins certain, c'est le rôle que joue l'autophagie dans le développement et la progression de la pathologie. En effet, les patients SLA porteurs d'une mutation du gène *SOD1* surexpriment beclin, un acteur essentiel dans l'initiation de l'autophagie. Cependant, l'ablation partielle de ce gène afin de ramener l'autophagie à un niveau plus physiologique semble dans certaines études, bénéfique (Tokuda et al., 2016) et dans d'autres, délétère (Nassif et al., 2014). Il s'avère que le mutant *SOD1*<sup>G93A</sup> interagit avec beclin. Cela conduit à une rétention de beclin, une diminution de l'autophagie et donc à une accumulation d'agrégats SOD1. Afin de compenser cela, la cellule surexprime beclin.

Les gènes *TBK1*, *P62* et *OPTN* jouent un rôle prépondérant dans l'autophagie en tant qu'adaptateurs protéiques dans la macroautophagie sélective. Un certain nombre de mutations de *P62* dans la SLA sont localisées au niveau du domaine LIR de liaison à LC3. Cela entraîne une délocalisation de P62 hors de l'autophagosome et une perturbation de la macroautophagie sélective (Goode et al., 2016). Des résultats similaires ont été obtenus lors d'une délétion du domaine de liaison à l'ubiquitine du gène *OPTN*. Les neurones présentaient une diminution de la clairance des agrégats protéiques associée à une perturbation du flux autophagique (Shen et al., 2015). P62 et OPTN semblent également être liés à la mitophagie (Wong and Holzbaur, 2014). Enfin, certaines mutations de *TBK1* entraînent un blocage de l'interaction entre TBK1 et OPTN ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de cette dernière. Les neurones présentent alors une perturbation de la clairance des mitochondries endommagées et de la liaison de OPTN à l'ubiquitine (Richter et al., 2016). TBK1 est d'autant plus essentielle qu'elle intervient dans la défense immunitaire médiée par l'autophagie (Pilli et al., 2012).

Le gène *UBQLN2*, codant pour l'ubiquiline, est également impliqué dans la dégradation protéique en participant à la fois à l'AMC et à la voie UPS. Les mutations de ce gène en lien avec la SLA ont montré une diminution de l'interaction entre *UBQLN2* et *HSP70*, une chaperonne essentielle dans l'AMC (Hjerpe et al., 2016, Teyssou et al., 2017).

Enfin, la protéine *PGRN* joue un rôle important dans l'autophagie dans les cellules gliales et neuronales. Des souris déficientes en progranuline présentent une induction importante de l'expression de gènes de l'autophagie associée à des perturbations de la dégradation lysosomale et à une accumulation de lysosome dans les cellules gliales (Tanaka et al., 2013, Tanaka et al., 2014). Un résultat similaire a été obtenu dans les neurones de souris présentant une haploinsuffisance de *Pgrn* (Evers et al., 2017). Les neurones déficients pour ce gène présentent également une accumulation de protéine *TDP43* ainsi qu'une diminution de l'activité lysosomale, liée à une diminution de l'activité de la cathepsine D (Valdez et al., 2017). Une étude récente a mis en évidence le rôle essentiel de la progranuline dans l'acidification du lysosome (Tanaka et al., 2017).

## B. Modulateurs indirects

Le gène *TARDBP* ne joue pas un rôle direct dans l'autophagie. Cependant, Schwenk et al ont montré que sa répression ou sa mutation au niveau du domaine de translocation nucléaire provoquait une diminution du trafic endocytaire (Schwenk et al., 2016). *TDP43* est également un régulateur (indirect) négatif de l'autophagie par induction de l'expression de raptor, une protéine qui agit en synergie avec *mTOR* pour réprimer l'autophagie. De plus *TDP43* participe à la rétention de *TFEB*, un facteur de transcription inducteur de l'autophagie. Dans cette même étude, la répression de *TDP43* diminue l'expression de la dynactine et entraîne une délocalisation d'une partie des lysosomes dans l'ensemble du cytoplasme (Xia et al., 2016). Plusieurs articles ont par ailleurs démontré l'effet bénéfique d'une stimulation de l'autophagie dans la clairance des agrégats *TDP43* (Chang et al., 2016, Wang et al., 2012, Wang et al., 2015).

La protéine *TAU* représente un enjeu dans la SLA et la DFT de par sa capacité à former des fibrilles insolubles en présence ou non d'une mutation dans le gène *MAPT* (Cohen et al., 2011). La mutation de ce gène entraîne une perturbation du trafic endocytaire dont les vésicules transitent par les microtubules. De plus, une étude a montré que la dégradation de *TAU* était différente en fonction de sa nature (protéine mutante ou endogène). En effet, la protéine *TAU* endogène est généralement dégradée par microautophagie ou AMC alors que le mutant *A152T* est éliminé par macroautophagie ou AMC (Caballero et al., 2018). Néanmoins, il semblerait que l'induction pharmacologique de l'autophagie réduise la quantité de mutant *TAU* soluble et insoluble (Berger et al., 2006, Kruger et al., 2012). Des résultats similaires ont été obtenus sur un modèle de tauopathie chez le poisson zèbre où l'induction de l'autophagie diminue la proportion de protéine *TAU* phosphorylée et améliore le phénotype général des animaux (Lopez et al., 2017).

La mutation de *FUS* entraîne également des altérations du processus autophagique. Les mutations R522G et P525L sont à l'origine d'une répression générale de l'autophagie avec une diminution de la formation d'autophagosomes, de la clairance des protéines ubiquitinylées et une perturbation de la fusion entre autophagosomes et lysosomes. Cependant, la surexpression de *RABI* semble limiter cette répression de l'autophagie par une relocalisation de FUS hors des granules de stress. A noter toutefois que cette étude a été réalisée *in vitro* et que l'analyse de tissus post-mortem de patients porteurs d'une mutation proche (R521C) révèle une augmentation du nombre d'autophagosomes (Soo et al., 2015). Le mutant *FUS* semble donc réprimer indirectement l'autophagie et entraîner l'accumulation de granules de stress et d'inclusions protéiques jusqu'à un certain stade à partir duquel d'autres voies de signalisation se mettent en place et induisent l'autophagie. Il a d'ailleurs été montré que l'induction de l'autophagie diminue le nombre de granules de stress *in vitro* (Ryu et al., 2014).

*C9ORF72* est une protéine complexe dont le rôle dans la cellule est encore très mal compris et l'effet de ses mutations par expansion est difficilement discernable. En effet, deux études ont publié en 2016 des résultats contradictoires concernant les conséquences du mutant sur l'autophagie. La première a montré que la répression de *C9ORF72* dans des cellules iPS de patients entraînait une accumulation de P62 et une diminution de la lipodation de LC3 et donc de la formation d'autophagosomes (Webster et al., 2016). Dans la seconde étude, Ugolino et al ont utilisé des fibroblastes murins comme modèle d'étude. Leurs résultats montrent que la répression de *C9orf72* mène à l'induction de l'autophagie par la translocation de TFEB et l'inactivation de mTOR (Ugolino et al., 2016). Ainsi, le rôle de *C9ORF72* muté semble différent en fonction du type cellulaire. Enfin, un nouveau rôle de *C9ORF72* a récemment été proposé. Par interaction avec P62, SMN et FUS, lorsque ce dernier est méthylé par PRMT5, *C9ORF72* favorise la clairance des granules de stress (Chitiprolu et al., 2018).



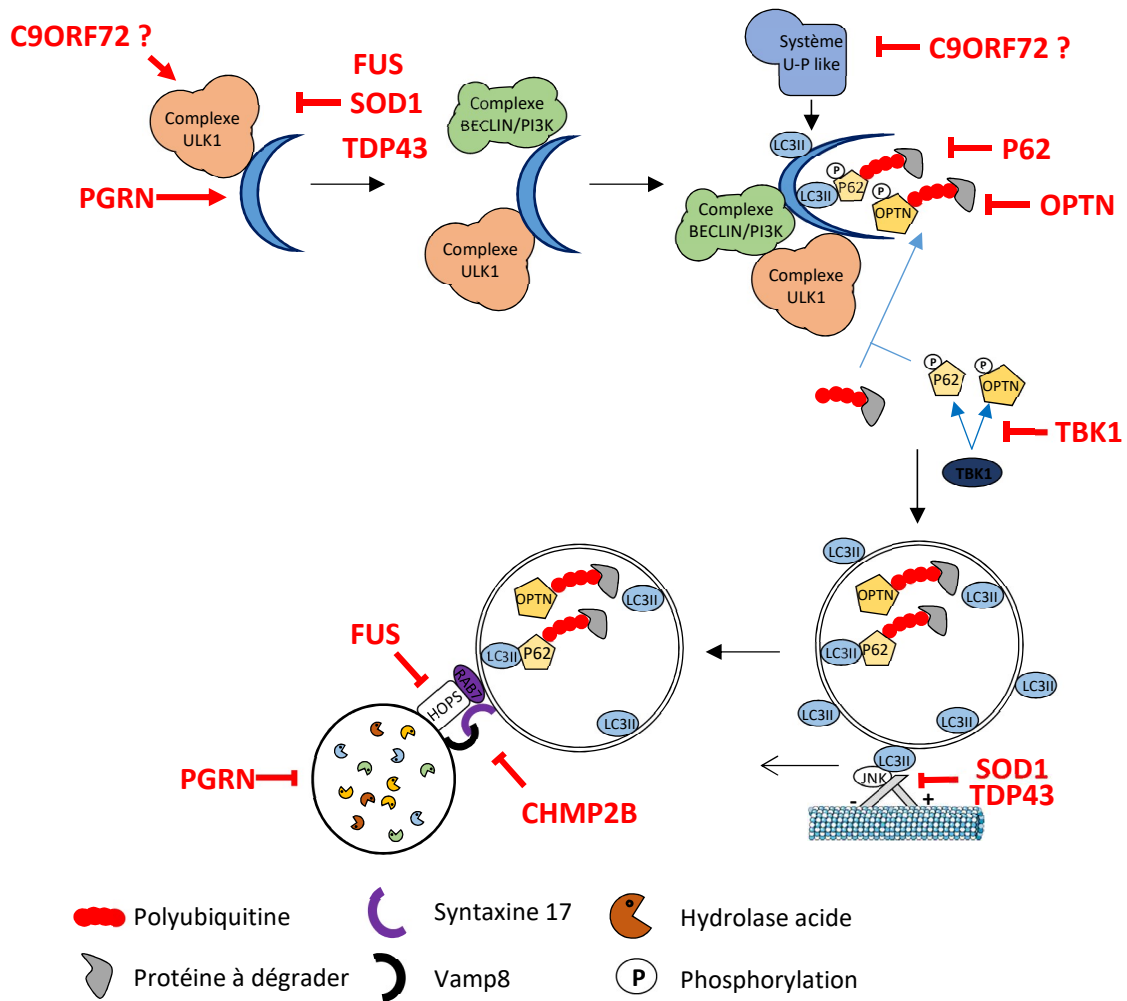


Figure 16 : Impact des différents mutants liés à la SLA et/ou la DFT sur le processus autophagique U-P : ubiquitine-protéasome

### III. Le gène *CHMP2B*

#### 1. Structure de CHMP2B

Le gène *CHMP2B* (charged multivesicular body protein 2b) est localisé sur le chromosome 3 du génome humain. Il se compose de 6 exons et permet la formation d'une protéine unique de 213 acides aminés. La partie N-terminale de la protéine comporte un domaine basique alors que la partie C-terminale comporte un domaine acide. Le seul domaine d'interaction connu de la protéine se situe sur sa partie C-terminale et lui permet de se lier à VPS4 (vacuolar protein sorting 4). Les deux domaines acide et basique interagissent ensemble entraînant un repliement de la protéine et son auto-inhibition. L'interaction avec VPS4 permet de lever cette inhibition (Figure 17) (Fontana et al., 2015).



Figure 17 : Structure de la protéine CHMP2B

La protéine CHMP2B possède un domaine de liaison à VPS4 appelé domaine MIM (MIT-interacting Motifs).

#### 2. Fonction de CHMP2B

##### A. CHMP2B et complexes ESCRT

La principale fonction connue de la protéine CHMP2B est liée à son appartenance au complexe ESCRT-III. Ces complexes ESCRT sont au nombre de 4 (numérotés de 0 à 3) et agissent en synergie afin de promouvoir la scission membranaire, processus primordial dans l'endocytose, le bourgeonnement viral et la cytokinèse. La particularité de ce processus est qu'il permet uniquement l'évagination d'une vésicule, c'est-à-dire que les protéines ciblées par les complexes ESCRT quitteront le cytoplasme (Figure 18).

- ESCRT-0 :

Ce complexe se compose des protéines HRS (hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) et STAM1/2 (signal transducing adaptor molecule 1/2) (Figure 18)(Asao et al., 1997). Elles possèdent un domaine de liaison à l'ubiquitine leur permettant de cibler les protéines marquées par l'ubiquitine. En plus de cela, HRS possède un domaine de liaison au phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P), un constituant majeur des membranes cellulaires (Mao et al., 2000). Le rôle de ce complexe va donc être de reconnaître et de se fixer aux protéines ubiquitinylées proches des membranes cellulaires, par exemple au niveau des endosomes précoces.

- ESCRT-I:

Ce complexe, constitué de TSG101 (tumor susceptibility gene 101), hVPS28 (human vacuolar protein sorting 28) et VPS37 a été mis en évidence pour la première fois en 2001 (Katzmann et al., 2001). Par la suite, des études ont montré que la protéine hMBS12 (human multivesicular bodies subunit 12) faisait également partie de ce complexe (Chu et al., 2006). L'interaction entre ESCRT-0 et ESCRT-I se fait *via* le domaine UEV (ubiquitin E2 variant) de TSG101 qui reconnaît le domaine PTAP-like de HRS (Figure 18)(Lu et al., 2003).

- ESCRT-II

Ce complexe est composé de EAP45 (EAP-associated protein of 45KDa), EAP20 et EAP30. Il est recruté par hVPS28 qui interagit avec le domaine GLUE (gram-like ubiquitin-binding in EAP45) de EAP45 (Babst et al., 2002, Gill et al., 2007). Le domaine GLUE permet également au complexe de reconnaître et lier l'ubiquitine ainsi que le phosphatidylinositol-3-phosphate (Figure 18) (Slagsvold et al., 2005). Le rôle de ce complexe est de recruter les membres du complexe ESCRT-III puis de catalyser sa formation.

- ESCRT-III et VPS4

Le dernier complexe ESCRT se compose des protéines CHMP4, CHMP6, CHMP3 et **CHMP2** (Figure 18). Les protéines CHMP4 et CHMP2 sont respectivement retrouvées sous trois et deux formes nommées A, B (et C dans le cas de CHMP4). Contrairement aux autres complexes ESCRT, les membres de ESCRT-III se trouvent sous une forme auto-inhibée par interaction de leur partie C-terminale avec leur partie N-terminale (Zamborlini et al., 2006). Leur interaction avec d'autres protéines ESCRT lèvera cette inhibition.

La formation de ESCRT-III débute par le recrutement de CHMP6 par EAP20. CHMP6 va ensuite recruter CHMP4 qui formera des homo-oligomères permettant le recrutement de CHMP3 qui favorisera le recrutement de CHMP2. Le complexe ESCRT-III forme une structure hélicoïdale qui va permettre la déformation de la membrane en créant une zone de constriction (Bodon et al., 2011, Guizetti et al., 2011, Henne et al., 2012). D'autres complexes viennent s'ajouter à ces protéines notamment BRO1/ALIX et IST1 et DID2. Leur rôle sera de stabiliser la structure des complexes ESCRT mais aussi de favoriser le recrutement de VPS4 qui interagit avec les domaines MIM (MIT-interacting Motifs) situés sur l'ensemble des protéines CHMP.

La scission de la vésicule sera réalisée par VPS4. Il s'agit d'une ATPase qui va fournir l'énergie nécessaire à la réaction de scission (Babst et al., 1997). Cette protéine va former un anneau composé de plusieurs homo-hexamères associés à VTA1P (Yu et al., 2008). En plus de permettre la scission de la vésicule, VPS4 va également catalyser le démantèlement du complexe ESCRT-III. Les études de mutants de *Vps4* chez la levure ont en effet mis en évidence le piégeage du complexe ESCRT-III associé à Vps4 le long d'endosomes de taille importante (Babst et al., 1998).

Complexe	Protéines		liaison à la membrane	liaison à la protéine cible	interactions intercomplexes
	Levure	Homme			
ESCRT-0	Vps27	HRS	Vps27	Hse1 et Vps27	Vps27 (ESCRT-0) avec Vps23 (ESCRT-I)
	Hse1	STAM1/2			
ESCRT-I	Vps23	TSG101	Vps37	Vps23 et Mvb12	Vps28 (ESCRT-I) avec Vps36 (ESCRT-II)
	Vps28	hVPS38			
	Vps37	VPS37A, B, C			
	Mvb12	hMVB12A, B			
ESCRT-II	Vps36	EAP45	Vps36	Vps36	Vps25 (ESCRT-II) avec Vps20 (ESCRT-III)
	Vps22	EAP30			
	Vps25	EAP20			
ESCRT-III	Vps20	CHMP6	Vps20* et CHMP3*	Elimination des étiquettes Ubiquitine	Vps4 avec le domaine des protéines CHMP (ESCRT-III)
	Snf7	CHMP4A ,B, C			
	Vps24	CHMP3			
	Vps2	<b>CHMP2A, B</b>			

Figure 18 : Protéines des complexes ESCRT et leurs interactions

Les protéines des complexes ESCRT-0, I et II interagissent en permanence avec les membres de leur complexe. Les protéines du complexe ESCRT-III en revanche sont sous une forme inhibée dans le cytoplasme. C'est lors de leur activation par les protéines des autres complexes ESCRT qu'elles deviennent actives et forment le complexe ESCRT-III. Le symbole « \* » signifie que la protéine subit une modification d'ordre post-traductionnel ou structural avant de pouvoir interagir avec la membrane. Image adaptée de (Henne et al., 2011).

## B. Les complexes ESCRT dans l'endocytose

L'implication des complexes ESCRT la mieux caractérisée concerne le processus d'endocytose. Lors de la fixation d'un ligand sur son récepteur, il peut arriver que la partie cytoplasmique du récepteur soit phosphorylée entraînant alors son internalisation. Cette internalisation fait intervenir des protéines de clathrine recouvrant la vésicule néo formée qui sera alors dirigée vers un endosome précoce avec lequel elle fusionnera. Ce processus est important dans les phénomènes de désensibilisation, afin de stopper la signalisation liée à un ligand présent en grande quantité dans le milieu extracellulaire.

Le rôle des complexes ESCRT se situe en aval de cette internalisation. En effet, lorsque le récepteur est internalisé puis fusionne avec l'endosome précoce, la partie intracellulaire du récepteur est toujours présente dans le cytosol et la voie de signalisation associée continue à être activée. Les complexes

ESCRT, en promouvant l'invagination de la membrane de l'endosome précoce permettent de stopper la voie de signalisation active (Figure 19 et 20).

Comme décrit précédemment, un récepteur qui doit être dégradé ou bloqué sera marqué par une protéine d'ubiquitine. Cela permettra le recrutement successif de ESCRT-0, I, II et III. Le principal rôle des complexes 0 et I est la reconnaissance de la protéine cible et l'ancrage à la membrane de l'endosome. Les complexes ESCRT-II et III ont un rôle davantage tourné vers l'invagination et la scission de la membrane car ils sont dépourvus de domaine de liaison à l'ubiquitine. Avant leur internalisation dans la lumière de l'endosome, les « étiquettes ubiquitines » seront éliminées des protéines cibles *via* AMSH (McCullough et al., 2006) ou l'isopeptidase Y (Row et al., 2006) qui interagissent avec STAM (ESCRT-0).

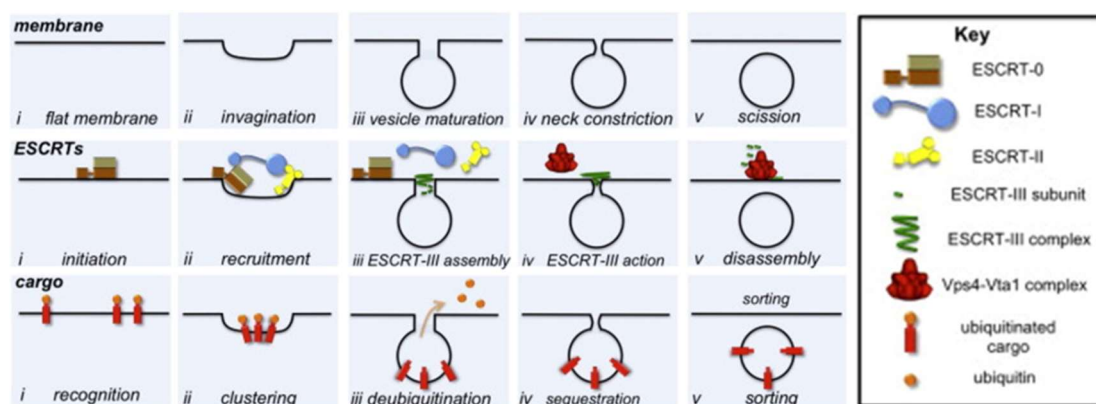


Figure 19 : Rôle des complexes ESCRT dans l'endocytose

Les complexes ESCRT-0 et I se lient à la membrane de la structure (généralement un endosome) mais aussi aux protéines marquées à l'ubiquitine. Le complexe ESCRT-II est ensuite recruté et permet la formation du complexe ESCRT-III. Ces deux derniers invaginent la membrane et, par consommation d'ATP et intervention de VPS4, le cou formé au niveau de la membrane se referme progressivement jusqu'à séparation des deux membranes. VPS4 catalyse finalement la dissociation du complexe ESCRT-III. Image tirée de (Henne et al., 2011).

### C. Complexes ESCRT et bourgeonnement viral

CHMP2B et plus généralement les complexes ESCRT interviennent dans le bourgeonnement viral (Figure 20) (Garrus et al., 2001). La protéine virale P6 est capable de recruter TSG101 *via* un domaine identique à celui qui permet à HRS de recruter TSG101 (Martin-Serrano et al., 2001, von Schwedler et al., 2003). D'autres protéines impliquées dans la formation de virions sont capables d'interagir avec des membres des complexes ESCRT. C'est le cas de P9 et P2 qui recrutent respectivement les protéines ALIX et NEDD4, une ligase ubiquitine impliquée dans la fixation de groupements ubiquitine (Garnier et al., 1996, Strack et al., 2003).

## D. Complexes ESCRT et cytokinèse

La fonction de scission membranaire des complexes ESCRT est également nécessaire à la cytokinèse, c'est-à-dire à l'étape finale de la division cellulaire (Figure 20). Carlton et Martin-Serrano ont montré que lors de la cytokinèse, les protéines TSG101 et ALIX colocalisent avec CEP55, une protéine du centrosome située au niveau du point de jonction des deux cellules en cours de séparation (Carlton and Martin-Serrano, 2007). La machinerie ESCRT semble indispensable à ce processus. En effet, la transfection de dominants négatifs de CHMP3 et VPS4 inhibe la scission entre deux cellules en fin de duplication (Dukes et al., 2008).

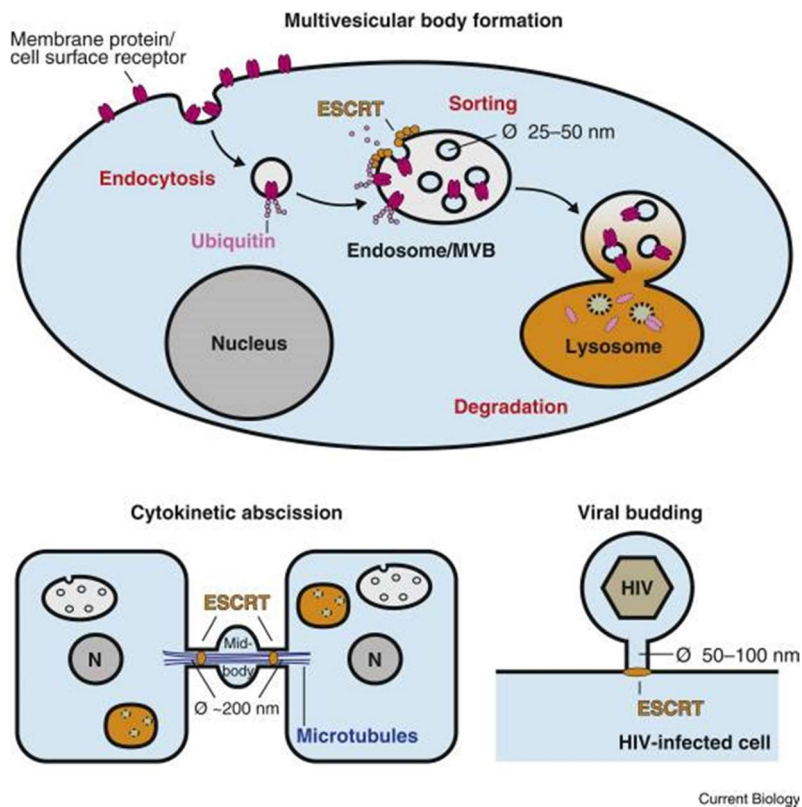


Figure 20 : Rôle des complexes ESCRT dans les phénomènes de scission membranaire

Les complexes ESCRT jouent un rôle dans trois processus impliquant une scission membranaire : l'endocytose et plus particulièrement la formation de corps multivésiculaires (ou endosomes tardifs), la cytokinèse et le bourgeonnement viral. Image tirée de (Schmidt and Teis, 2012).

## E. Complexes ESCRT et formation et stabilisation des épines dendritiques

Les épines dendritiques sont des excroissances situées le long des dendrites des neurones. Elles correspondent à la partie post-synaptique d'une connexion entre deux neurones. Le rôle de ces structures est de recevoir et de transmettre un potentiel d'action envoyé par un neurone avec lequel le neurone communique *via* une synapse. La plasticité synaptique est la capacité du cerveau à former, dégrader ou reformer différentes connexions entre les neurones. Ainsi, que ce soit dans le cadre d'une

blesse ou d'un entraînement répété à une certaine discipline, les connexions entre les neurones évoluent tout au long de la vie. Il existe 3 types d'épines dendritiques :

-L'épine dendritique « trapue » : elle est aussi large d'une extrémité à l'autre et finit par un demi-cercle. Elle mesure en moyenne 1µm et est prédominante lors du développement post-natal (Harris et al., 1992).

-L'épine dendritique fine : elle se compose d'un cou long et fin et d'une tête plus petite en forme de bulbe. Elle mesure en moyenne 1,7µm et est prédominante à l'âge adulte (Harris et al., 1992).

-L'épine dendritique en forme de champignon : elle se compose d'un cou mais surtout d'une tête beaucoup plus larges que l'épine dendritique fine. Elle mesure environ 1,5µm. La taille importante de sa tête et sa surface de contact synaptique élevée rendent ce type d'épine dendritique plus stable que les autres (Peters and Kaiserman-Abramof, 1970).

De par leur capacité à courber ou invaginer les membranes de la cellule, les complexes ESCRT et plus particulièrement CHMP2B jouent un rôle important dans la formation des épines dendritiques. Des immunomarquages ont montré une colocalisation entre CHMP2B et PSD95, une protéine localisée au niveau des épines dendritiques. De plus, l'utilisation de shARN contre *CHMP2B* provoque une diminution du nombre d'épines dendritiques. Cela entraîne également une diminution de la proportion d'épines dendritiques en forme de champignon, qui sont les plus stables au profit d'épines dendritiques fines (Belly et al., 2010). D'un point de vue fonctionnel, les neurones privés de CHMP2B présentent une amplitude du courant postsynaptique plus faible (Chassefeyre et al., 2015).

### 3. Le gène *CHMP2B* dans la SLA et la DFT

#### A. Découverte dans la SLA et la DFT

La première mutation du gène *CHMP2B* a été découverte dans une famille danoise en 2005. Les individus présentant des troubles caractéristiques de la DFT étaient tous porteurs d'une mutation ponctuelle, substitution d'une guanine en cytosine au niveau du site d'épissage de l'exon 6. Cette mutation entraîne la formation de 2 transcrits aberrants appelés « intron5 » ou « Δ10 » (en fonction de l'épissage du transcrit) (Figure 21). Le premier transcrit (intron5) se compose de 201 paires de bases supplémentaires par rapport au transcrit endogène et code une protéine dont les 177 premiers acides aminés sont identiques à ceux de la protéine CHMP2B. Le 178<sup>e</sup> est une Valine au lieu d'être une méthionine puis survient un codon stop entraînant une perte des 35 derniers acides aminés (Figure 21). Le transcrit « Δ10 » présente une perte de 10 paires de bases par rapport au transcrit endogène (2400 paires de base au lieu de 2410). Les modifications de la séquence polypeptidique interviennent également à partir du 178<sup>e</sup> acide aminé. La suite de la séquence d'acides aminés est complètement différente. La protéine mutante présente également 7 acides aminés de moins que CHMP2B (206 au

lieu de 213) (Figure 21) (Skibinski et al., 2005). Un an plus tard, deux nouvelles mutations ont été découvertes chez deux patients respectivement atteints d'une atrophie musculaire progressive (AMP) et d'une SLA accompagnée d'une DFT. L'individu atteint d'AMP présentait une mutation au niveau de la base 694 où une cytosine remplaçait une adénine, entraînant la traduction d'un acide aminé histidine à la place d'une glutamine. Le 2<sup>e</sup> patient présentait une substitution d'une adénine en guanine, donnant une modification du 29<sup>e</sup> acide aminé (valine à la place d'isoleucine) (Parkinson et al., 2006).

Human Wild-type	1	MASLFKKK	TVDDVI	KEQNRELRGTQRAI	IRDRAALEKQEKQLELEIKKMAKIGNKEACKVLAKQLVHLRQKQTRTFVAVSSKVTSMSTQTKVMNSQMKMAGAMSTTAKI	
Human Intron5	1	MASLFKKK	TVDDVI	KEQNRELRGTQRAI	IRDRAALEKQEKQLELEIKKMAKIGNKEACKVLAKQLVHLRQKQTRTFVAVSSKVTSMSTQTKVMNSQMKMAGAMSTTAKI	
Human Δ10	1	MASLFKKK	TVDDVI	KEQNRELRGTQRAI	IRDRAALEKQEKQLELEIKKMAKIGNKEACKVLAKQLVHLRQKQTRTFVAVSSKVTSMSTQTKVMNSQMKMAGAMSTTAKI	
Human Q165X	1	MASLFKKK	TVDDVI	KEQNRELRGTQRAI	IRDRAALEKQEKQLELEIKKMAKIGNKEACKVLAKQLVHLRQKQTRTFVAVSSKVTSMSTQTKVMNSQMKMAGAMSTTAKI	
Mouse	1	MASLFKKK	TVDDVI	KEQNRELRGTQRAI	IRDRAALEKQEKQLELEIKKMAKIGNKEACKVLAKQLVHLRQKQTRTFVAVSSKVTSMSTQTKVMNSQMKMAGAMSTTAKI	
Rat	1	MASLFKKK	TVDDVI	KEQNRELRGTQRAI	IRDRAALEKQEKQLELEIKKMAKIGNKEACKVLAKQLVHLRQKQTRTFVAVSSKVTSMSTQTKVMNSQMKMAGAMSTTAKI	
Chicken	1	MASLFKKK	TVDDVI	KEQNRELRGTQRAI	IRDRAALEKQEKQLELEIKKMAKIGNKEACKVLAKQLVHLRQKQTRTFVAVSSKVTSMSTQTKVMNSQMKMAGAMSTTAKI	
Pufferfish	1	--VVCVLL	LYQDI	IKESRELRSTQRAI	ARDRAALEKQEKQLELEIKKMAKIGNKEACKVLAKQLVHLRQKQTRTFVAVSSKVTSMSTQTKVMNSQMKMAGAMSTTAKI	
Zebrafish	1	MASLFKKK	TVDDVI	KEQNRELRGTQRAI	IRDRAALEKQEKQLELEIKKMAKIGNKEACKVLAKQLVHLRQKQTRTFVAVSSKVTSMSTQTKVMNSQMKMAGAMSTTAKI	
Drosophila	1	MFNNIFGKKK	TVKQRE	ENRSR	LRKATRDIEERRRKLEBEERKLELEIKHNAAGNNIACRILAKQLVHLRQKQTRTFVAVSSKVTSMSTQTKVMNSQMKMAGAMSTTAKI	
Human Wild-type	109	MQAVNKKMDPQKTLQTMQNFQKENMKMEMTEEMINDTLDDIFDGSDEEESQDIVNOVLDEIGIEISGKMAKAPSAARSLPSAS	--	TSKA	TI	SDEEIERQLKALGVD
Human Intron5	109	MQAVNKKMDPQKTLQTMQNFQKENMKMEMTEEMINDTLDDIFDGSDEEESQDIVNOVLDEIGIEISGKMAKAPSAARSLPSAS	--	TSKA	TI	SDEEIERQLKALGVD
Human Δ10	109	MQAVNKKMDPQKTLQTMQNFQKENMKMEMTEEMINDTLDDIFDGSDEEESQDIVNOVLDEIGIEISGKMAKAPSAARSLPSAS	--	TSKA	TI	SDEEIERQLKALGVD
Human Q165X	109	MQAVNKKMDPQKTLQTMQNFQKENMKMEMTEEMINDTLDDIFDGSDEEESQDIVNOVLDEIGIEISGKMAKAPSAARSLPSAS	--	TSKA	TI	SDEEIERQLKALGVD
Mouse	109	MQAVNKKMDPQKTLQTMQNFQKENMKMEMTEEMINDTLDDIFDGSDEEESQDIVNOVLDEIGIEISGKMAKAPSAARSLPSAS	--	TSKA	TI	SDEEIERQLKALGVD
Rat	109	MQAVNKKMDPQKTLQTMQNFQKENMKMEMTEEMINDTLDDIFDGSDEEESQDIVNOVLDEIGIEISGKMAKAPSAARSLPSAS	--	TSKA	TI	SDEEIERQLKALGVD
Chicken	109	MQAVNKKMDPQKTLQTMQNFQKENMKMEMTEEMINDTLDDIFDGSDEEESQDIVNOVLDEIGIEISGKMAKAPSAARSLPSAS	--	TSKA	TI	SDEEIERQLKALGVD
Pufferfish	107	MQAVNKKMDPQKTLQTMQNFQKENMKMEMTEEMINDTLDDIFDGSDEEESQDIVNOVLDEIGIEISGKMAKAPSAARSLPSAS	--	TSKA	TI	SDEEIERQLKALGVD
Zebrafish	109	MQAVNKKMDPQKTLQTMQNFQKENMKMEMTEEMINDTLDDIFDGSDEEESQDIVNOVLDEIGIEISGKMAKAPSAARSLPSAS	--	TSKA	TI	SDEEIERQLKALGVD
Drosophila	111	MGEINRVMRPEAIGETIRRFQANMKMEMTEEMINDTLDDIFDGSDEEESQDIVNOVLDEIGIEISGKMAKAPSAARSLPSAS	--	TSKA	TI	SDEEIERQLKALGVD

Figure 21 : Séquence poly-peptidique de CHMP2B chez différentes espèces et ses principaux mutants. La protéine humaine CHMP2B possède 213 acides aminés. La protéine murine présente 99% d'homologie avec la protéine humaine, avec un seul acide aminé différent. Le fond noir présente les acides aminés identiques et le fond gris les équivalences entre espèces. Les modifications liées aux mutants « intron 5 » et « Δ 10 » sont soulignées (Image tirée de (Urwin et al., 2009)).

## B. Mutations connues

Les mutations du gène *CHMP2B* sont à l'origine de moins de 1% des cas de DFT et/ou de SLA. A l'heure actuelle, 12 mutations du gène ont été découvertes chez des patients atteints de troubles moteurs et/ou cognitifs (Cox et al., 2010, Ghanim et al., 2010, Parkinson et al., 2006, Skibinski et al., 2005, van Blitterswijk et al., 2012a, van der Zee et al., 2008). Parmi ces 12 mutations, 5 d'entre elles sont associées à la SLA et 4 à la DFT. Les trois dernières ont été découvertes chez des patients atteints respectivement de SLA-DFT, d'AMP et de Démence CorticoBasale (DCB) (Figure 22). L'AMP entraîne une dégénérescence des motoneurons spinaux à l'origine d'une atrophie musculaire et de fasciculations. La DCB est une maladie neurodégénérative entraînant des troubles moteurs, linguistiques et mnésiques. La plupart des mutations sont des mutations ponctuelles faux sens entraînant la modification d'un seul acide aminé de la protéine, exception faite de la mutation Q165X qui provoque un arrêt prématuré de la traduction de la protéine CHMP2B et de la mutation M178V/L (entraînant la formation du transcrit « *CHMP2B<sup>intron5</sup>* ») qui affecte l'épissage du transcrit et modifie la séquence peptidique en aval du site de mutation (Figure 22).



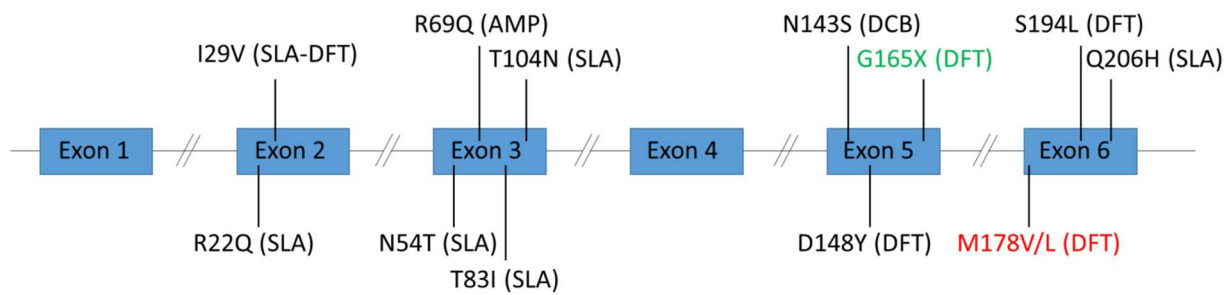


Figure 22 : Mutations du gène *CHMP2B* en lien avec des maladies neurodégénératives

Parmi ces 12 mutations, 5 causent une SLA et 4 causent une DFT. Une seule est à l'origine d'un syndrome SLA-DFT. Les deux dernières mutations sont associées chez l'Homme à une Atrophie Musculaire Progressive et à une Démence Corticobasale. La mutation rouge indique un décalage du cadre de lecture et la mutation verte indique une mutation non-sens. Les 10 autres sont des mutations faux-sens.

### C. Mécanismes pathologiques en lien avec le mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* et modèles animaux développés

#### a. Données *in vitro*

Au vu du rôle de la protéine CHMP2B dans la cellule, les premières études concernant la mutation *CHMP2B<sup>intron5</sup>* ont porté sur le processus d'endocytose. La transfection de ce mutant dans des lignées neuronales mène à la formation et l'accumulation de larges endosomes. Ces structures étant positives à la protéine mutante, il est possible que cette dernière ait un effet de dominance négative sur la protéine endogène (van der Zee et al., 2008). Une autre étude a montré dans la même lignée neuronale que l'expression du mutant « intron 5 » entraînait un retard de la fusion entre l'endosome et le lysosome, conduisant à l'accumulation de larges endosomes. Cette altération du trafic endolysosomal a été confirmée sur des fibroblastes de patients exprimant le mutant « intron 5 » et pourrait être liée à un défaut de recrutement de RAB7, un marqueur des endosomes tardifs impliqué dans la fusion entre l'endosome et le lysosome. Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, l'expression de *CHMP2B<sup>intron5</sup>* n'a pas d'effet sur l'internalisation de protéines au niveau de l'endosome précoce (Urwin et al., 2010). Han et al ont complété ces résultats en montrant que la dégradation de l'EGFR était plus lente dans les neurones exprimant *CHMP2B<sup>intron5</sup>*. De plus, ils ont mis en évidence une accumulation de structures positives à LC3 en réponse à l'expression d'un mutant lié à *CHMP2B* (*CHMP2B<sup>T104N</sup>*) (Han et al., 2012).

La mutation de *CHMP2B* est associée à une augmentation de la proportion d'épines dendritiques fines et une diminution de la proportion d'épines dendritiques en forme de champignon. Les neurones exprimant ce mutant présentent également une arborisation moins importante et une diminution des croisements des dendrites (Belly et al., 2010, Chassefeyre et al., 2015).

Une étude récemment publiée a réalisé une analyse transcriptomique sur des cellules iPS de patients exprimant le mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>*. Zhang et al ont ainsi montré que les neurones dérivés d'iPS présentaient une accumulation de larges endosomes et de mitochondries associée à une induction du stress oxydatif. Très peu d'analyses concernant l'étude transcriptomique ont été publiées. Néanmoins, les principales voies affectées sont les membranes synaptique et post-synaptique, l'endosome précoce et le lysosome (Zhang et al., 2017).

#### b. Modèles animaux

Seuls 4 modèles animaux exprimant le mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* ont été générés jusqu'à maintenant.

Le premier est un modèle transgénique de drosophile développé par Fen-Biao Gao. Dans ce modèle, les articles qui ont été publiés traitent principalement des déformations oculaires et des voies cellulaires associées. Dans un premier article, il a été montré que l'expression du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* entraînait une légère déformation de l'œil de la drosophile associée à une dégénérescence massive des ommatidies. De plus, l'haploinsuffisance de certains membres de ESCRT-III amplifie cette déformation. Dans ce modèle, la toxicité de *CHMP2B<sup>intron5</sup>* semble passer par la voie médiée par les récepteurs TOLL (TLR chez les mammifères), impliqués dans le système immunitaire et la réponse antifongique et antibactérienne (Ahmad et al., 2009, Valanne et al., 2011). Lu et al ont ensuite démontré que la syntaxine 13, impliquée dans le trafic endosomal, était nécessaire à la maturation des autophagosomes et que sa répression exacerbait l'effet pathologique de *CHMP2B<sup>intron5</sup>* sur l'œil de la drosophile (Lu et al., 2013). La cause de cette déformation de l'œil a été par la suite imputée à un défaut du processus endolysosomal provoquant la surcharge de récepteurs membranaires comme NOTCH, à l'origine de dérégulations développementales (Cheruiyot et al., 2014). Enfin, une étude parue récemment a montré une induction de *Jnk*, un agent proapoptotique, dans les neurones des drosophiles exprimant *CHMP2B<sup>intron5</sup>*. La répression de *Jnk* avec un ARN silencieux ou l'utilisation d'un mutant constitutivement actif de *Akt* diminuent l'activation de caspases, la mort neuronale et augmentent l'arborisation des neurones (West et al., 2018).

Le premier modèle murin dans lequel les souris expriment le mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* a été généré par Adrian Isaac et publié en 2012. Dans ce modèle, l'expression du mutant est sous le contrôle du promoteur du prion du hamster, entraînant une expression majoritairement neuronale et gliale. Les souris transgéniques présentent une espérance de vie réduite, la formation d'inclusions protéiques intraneuronales ainsi qu'une activation de la microglie et des astrocytes au niveau cortical et thalamique. Les inclusions protéiques présentes sont positives pour P62 et ubiquitine mais négatives pour TDP43 et TAU, comme chez les patients porteurs de cette mutation. Cette étude a également montré que l'extinction complète du gène *Chmp2b* n'entraînait ni formation d'inclusion protéique intraneuronale, ni phénotype moteur ou comportemental, ni mort prématurée de l'animal (Ghazi-Noori et al., 2012). Par la suite, il a été montré que le volume cérébral des souris exprimant le mutant

*CHMP2B*<sup>intron5</sup> diminuait principalement au niveau du thalamus et du cortex. Les troubles phénotypiques associés sont une diminution progressive de la force musculaire ainsi une diminution des interactions sociales. Les souris transgéniques présentent également une induction modérée de marqueurs pro-inflammatoires au stade présymptomatique. Cet effet inflammatoire s'intensifie au cours de l'évolution de la pathologie (Clayton et al., 2017).

Le deuxième modèle murin a été développé par Fen-Biao Gao, déjà à l'origine du modèle transgénique de drosophile. Dans ce modèle, les souris expriment le mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> sous le contrôle du promoteur CaMKIIa-tTA, permettant son expression au niveau des neurones du cortex frontal uniquement. Les souris exprimant le mutant présentent certaines caractéristiques retrouvées chez les patients atteints de DFT comme une diminution des interactions sociales et une activation des astrocytes au niveau du cortex frontal. De plus, des analyses biochimiques ont montré une induction des sous unités *Gria2*, 3 et 4 du récepteur AMPA, un des récepteurs glutamatergiques, à partir du stade symptomatique. En s'intéressant aux micros ARNs, ils ont ensuite mis en évidence une répression du micro ARN-124 spécifiquement dans le cortex. Ils ont également montré que cette répression était dépendante de l'expression du mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup>. Des dérégulations similaires ont été obtenues dans le cortex frontal de patients atteints de DFT présentant des inclusions positives à TDP43 (donc ne présentant pas de mutation du gène *CHMP2B*) ainsi que sur des cellules iPS de patients DFT. Enfin, l'induction du micro ARN-124 a permis chez les souris exprimant le mutant « intron 5 » une répression des gènes *Gria2* et 4 ainsi qu'une augmentation des interactions sociales en test des trois chambres. La répression directe de *Gria2* a eu le même effet sur ces souris (Gascon et al., 2014).

Le troisième modèle murin « *CHMP2B*<sup>intron5</sup> » a été généré et développé au laboratoire U1118 de l'INSERM (Vernay et al., 2016). Dans ce modèle, les souris transgéniques expriment le mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> sous le contrôle du promoteur Thy1.2 permettant une expression spécifiquement dans les neurones. Les souris transgéniques développent une paralysie progressive aboutissant à la mort aux alentours de 12 mois pour les souris homozygotes (HO) et 24 mois pour les souris hétérozygotes (HE). D'un point de vue phénotypique, les souris transgéniques développent des altérations comportementales comme une diminution des interactions sociales ou une diminution de l'anxiété. Les souris transgéniques, en particulier les HO présentent également des stéréotypies. En plus de ces caractéristiques apparentées à la DFT, elles développent des troubles moteurs tels qu'une diminution de la force musculaire et de l'endurance. Ces symptômes s'accompagnent d'une perte de masse pondérale. Au niveau histologique, les neurones exprimant le mutant présentent une accumulation d'inclusions protéiques positives pour *CHMP2B*<sup>intron5</sup>, P62 et ubiquitine et négatives pour TDP43, FUS et TAU. En réponse à ce stress neuronal, on observe chez ces souris une activation des astrocytes et de la microglie aux niveaux cortical et spinal. On observe également l'induction de marqueurs de dénervation associée à un découplage entre les parties pré et post synaptiques de la JNM (Figure 23).

Ma participation au sein de ce travail de caractérisation a porté sur **la description des inclusions protéiques observées (tri par taille et par zone cérébrale)**. J'ai ainsi pu montrer que les zones les plus concernées par la formation de ces inclusions protéiques étaient la **moelle épinière lombaire** et le **cortex frontal**. Les travaux associés à la caractérisation de cette lignée sont détaillés dans la seconde partie des annexes.

Caractéristiques des souris transgéniques CHMP2B <sup>intron5</sup>		
Caractéristiques histologiques et biochimiques	Neurone	-Expression du mutant <i>CHMP2B<sup>intron5</sup></i> -Inclusions protéiques P62 <sup>+</sup> /UBI <sup>+</sup> /TDP43/TAU -Diminution du diamètre axonal
	Glie	-Absence de CHMP2B <sup>intron5</sup> -Activation de la microglie -Activation des astrocytes
	Muscle	-Absence de CHMP2B <sup>intron5</sup> -Dénervation -Fragmentation de la JNM
Caractéristiques phénotypiques	Caractéristiques générales	-Perte de poids -Mort prématurée
	Troubles comportementaux	-Diminution de l'anxiété -Stéréotypies -Diminution des interactions sociales -Préférence alimentaire
	Troubles moteurs	-Diminution de l'endurance -Tremblements -Diminution de la force musculaire

Figure 23 : Caractéristiques des souris transgéniques du modèle CHMP2B<sup>intron5</sup>

## Problématique de thèse

La SLA et la DFT sont deux maladies neurodégénératives fatales. Décrites pour la première fois il y a plus d'un siècle, elles restent incurables et les seuls traitements existants présentent une efficacité modérée. L'espérance de vie moyenne des patients atteints de SLA ou de DFT est faible et leurs conditions de vie les empêchent de vivre normalement en société. L'absence de traitement curatif s'explique par la complexité et la versatilité de ces deux maladies. Dans plus de 70% des cas de DFT et 80% des cas de SLA, l'origine de la maladie est inconnue. De plus, la plupart des gènes identifiés présentent des dizaines de mutations différentes ayant des impacts variables sur la protéine et la cellule. Enfin, contrairement au postulat de départ, les neurones ne représentent pas le seul type cellulaire promouvant la maladie puisque les cellules gliales (et le muscle dans la SLA) semblent également participer à la progression de ces maladies.

Si les caractéristiques cliniques de ces deux pathologies sont dissemblables, il s'avère qu'elles sont liées par un continuum clinique, soutenu par des données génétiques et histologiques. C'est en 2006 que *CHMP2B*, le premier gène du continuum SLA-DFT a été découvert dans les deux maladies. Par la suite, de nombreux gènes sont venus grossir les rangs de ce continuum. Cependant, très peu de modèles animaux développant des caractéristiques mixtes de la SLA et la DFT ont été développés. C'est pourquoi le laboratoire a généré et caractérisé un modèle transgénique dans lequel les souris expriment le mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* spécifiquement dans les neurones. Cette caractérisation nous a permis de montrer que les souris transgéniques de ce modèle développent progressivement des altérations comportementales et motrices proches de celles des patients atteints de SLA ou de DFT ainsi que des caractéristiques histopathologiques associées aux deux maladies. Cependant, les mécanismes mis en jeu dans ces deux maladies sont encore très peu compris, en particulier chez les patients porteurs d'une mutation dans le gène *CHMP2B*. Mon objectif de thèse a ainsi été de déterminer quel était l'impact de l'expression neuronale du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* aux niveaux cellulaire et tissulaire. Cet objectif s'est découpé en trois parties distinctes.

J'ai tout d'abord cherché à mettre en évidence les altérations transcriptomiques en lien avec le mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>*. Pour cela, j'ai réalisé une étude du transcriptome par séquençage ARN sur la moelle épinière lombaire de souris transgéniques et non transgéniques à trois stades, asymptomatique, symptomatique et terminal. Cela m'a permis d'étudier l'impact du mutant au cours de la progression de la pathologie, ce que l'analyse de tissus de patients ne permet pas (celle-ci étant inévitablement réalisée sur des tissus post-mortem). Les analyses bio-informatiques réalisées par la suite ont mis en évidence des dérégulations de gènes associées au métabolisme lipidique et à l'inflammation au stade

présymptomatique. Après l'apparition des symptômes, les dérégulations transcriptomiques concernent principalement l'activité électrique du neurone.

Cette analyse a également révélé la dérégulation d'un autre groupe de gènes associés au lysosome. A partir de ces données ainsi que de celles de la littérature, mon travail a ensuite porté sur l'étude du processus autophagique en réponse à l'expression du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>*. Les résultats ont montré une accumulation précoce et progressive d'autolysosomes dans les neurones vulnérables associée à une répression du processus autophagique dans son ensemble. La comparaison de ces données avec celle d'un modèle murin de SLA (*SOD1<sup>G86R</sup>*) a montré des profils proches mais toute de même différents, augurant des mécanismes pathologiques distincts au sein de ce continuum.

La SLA est une maladie multifactorielle faisant intervenir plusieurs types cellulaires dont les neurones et le muscle. Cependant, le rôle de chacun de ces types cellulaires dans la progression de la maladie n'est pas clairement établi. C'est pourquoi la dernière partie de ma thèse a porté sur l'impact de l'expression neuronale du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* sur l'axe neuromusculaire. Les données obtenues ont permis de mettre en évidence une perturbation de cet axe neuromusculaire avec notamment une déstructuration de la JNM ainsi qu'une altération de l'expression de gènes en lien avec le métabolisme musculaire. Néanmoins, l'absence de certaines caractéristiques observées chez les patients atteints SLA soulève l'hypothèse d'une toxicité non neuronale du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>*.

L'ensemble de ces données permettra la publication de trois articles scientifiques détaillés dans la partie résultat. De plus, la caractérisation du modèle *CHMP2B<sup>intron5</sup>*, à laquelle j'ai participé, a été publiée en 2016 sous la forme d'un article disponible en annexe.

# Résultat

# Résultats

## I. Publication 1 : Analyse transcriptomique longitudinale des processus altérés dans un modèle de SLA et de DFT : des altérations du métabolisme lipidique et du système immunitaire à des perturbations de l'activité neuronale (soumise)

La SLA et la DFT sont deux maladies très complexes caractérisées par la dégénérescence de différentes populations neuronales. Cette neurodégénérescence massive survient suite à la perturbation de nombreux processus comme l'homéostasie protéique ou l'inflammation. Si un nombre important d'études transcriptomiques ont été réalisées sur des tissus (moelle épinière ou muscle) humains et murins exprimant un mutant *SOD1*, très peu concernent les patients atteints du syndrome SLA-DFT. Afin de mettre en évidence et de mieux comprendre les mécanismes pathologiques mis en jeu en réponse à l'expression du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* nous avons réalisé une analyse transcriptomique par séquençage d'ARN sur des échantillons de moelle épinière lombaire. Pour cela, 3 stades d'avancée des symptômes ont été utilisés : asymptomatique, symptomatique et terminal. Cela nous a ainsi permis de déterminer quels étaient les processus les plus précocement dérégulés ainsi que ceux les plus tardivement perturbés. Nous avons ainsi obtenu un total de 1063 gènes dérégulés avant l'apparition des symptômes, 2809 gènes dérégulés au stade symptomatique et enfin 4404 gènes dérégulés au stade terminal. Parmi ces ensembles de gènes, nous avons réalisé des analyses supplémentaires pour sélectionner uniquement ceux présentant un ratio de dérégulation inférieur à 0,67 ou supérieur à 1,5 par rapport aux souris contrôles ( $|\log_2 \text{fold change}| > \log_2(1.5)$ ). Cette sélection nous a permis d'identifier 281, 576 et 348 gènes à chacun de ces trois stades. Afin de déterminer à quels processus appartenaient ces gènes, nous avons ensuite eu recours à GeneOntology et ConsensusPathway Database qui sont deux bases de données. Nous avons ainsi mis en évidence au stade présymptomatique, l'altération de deux grands processus qui sont l'inflammation et le métabolisme des lipides. Au niveau de la réponse inflammatoire, nous avons montré une induction de la voie microgliale liée à TREM2 et à APOE, associée à la neurotoxicité. Concernant le métabolisme lipidique, les souris transgéniques présentent une altération de gènes liés à l'internalisation des lipides comme *ApoE*, *ApoC1* ou *Lpl*. En revanche, aux stades symptomatiques, la plupart des altérations observées portent sur l'activité électrique des neurones. Parmi ces gènes, 13 codent directement des sous-unités des canaux potassiques comme *Kcna1* et *Kcna2* ou sont associés à l'activité de ces canaux comme *Gnb3*. On observe également parmi les gènes de la famille des transporteurs SLC (solute carrier family) plusieurs gènes en lien avec le transport des neurotransmetteurs. Certains de ces processus sont retrouvés perturbés dans d'autres modèles de SLA-DFT ainsi que chez les patients atteints de ce syndrome. Ainsi, l'étude approfondie des mécanismes mis en place dans différents modèles appartenant à ce continuum SLA-DFT pourrait permettre la découverte de voies mécanistiques identiques pouvant être ciblées dans l'optique de futures thérapies.



**Longitudinal transcriptomic analysis of altered pathways in a CHMP2B<sup>intron5</sup>-based model of ALS-FTD: from immune system and lipid metabolism alterations to neuronal activity impairments.**

Waegaert Robin<sup>a</sup>, Dirrig-Grosch Sylvie<sup>a</sup>, Parisot Florian<sup>a</sup>, Keime Céline<sup>b</sup>, Henriques Alexandre<sup>a</sup>, Loeffler Jean-Philippe<sup>a</sup>, René Frédérique<sup>a#</sup>.

a : Université de Strasbourg, INSERM U1118 Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence, 11 rueumann, Strasbourg, France.

b : Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, INSERM U1258, CNRS, UMR7104, Université de Strasbourg, 1 Rue Laurent Fries, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

# Corresponding author : Frédérique René: frederique.rene@unistra.fr

11 rue human, Bâtiment 3, 67000 Strasbourg.

## ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia are two neurodegenerative diseases with currently no cure. These two diseases share a clinical continuum with overlapping genetic causes. Mutations in the *CHMP2B* gene are found in patients with ALS, FTD and ALS-FTD. To highlight deregulated mechanisms occurring in ALS-FTD linked to the *CHMP2B* gene, we performed a whole transcriptomic study on lumbar spinal cord from *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mice, a model that develops progressive motor alterations associated with dementia symptoms reminiscent of both ALS and FTD. To gain insight into the transcriptomic changes taking place during disease progression this study was performed at three stages: asymptomatic, symptomatic and end stage. We showed that before appearance of motor symptoms, the major disrupted mechanisms were linked with the inflammatory response and lipid metabolism. These processes were progressively replaced by alterations of neuronal electric activity as motor symptoms appeared, alterations that could lead to motor neuron death.

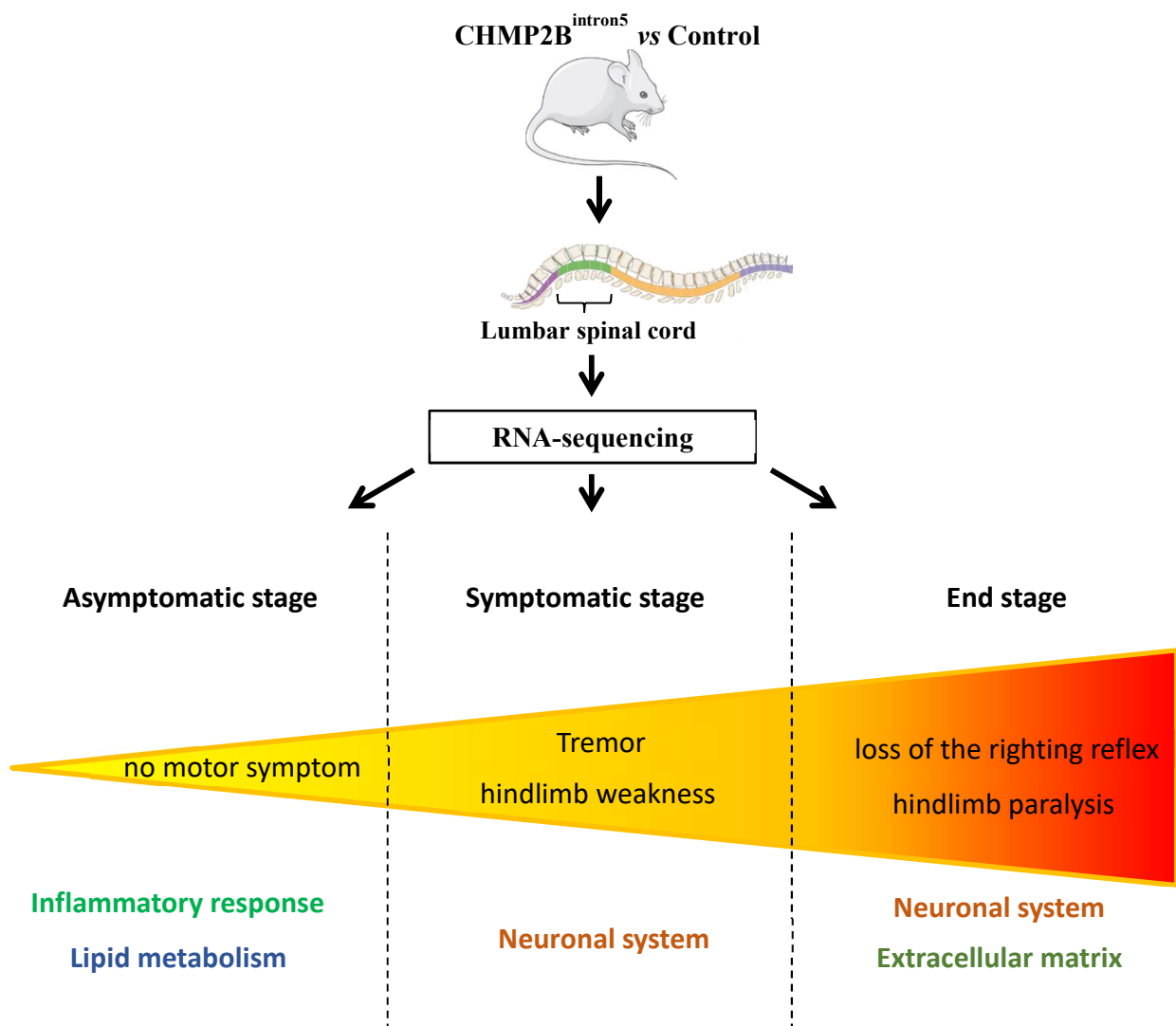
To investigate overlapping alterations in gene expression between two ALS-causing genes, we then compared the transcriptome of symptomatic *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mice with the one of *SOD1<sup>G86R</sup>* mice and found the same families deregulated providing further insights into common underlying dysfunction of biological pathways, disrupted or disturbed in ALS.

Altogether, this study provides a database to explore potential new candidate genes involved in the *CHMP2B<sup>intron5</sup>*-based pathogenesis of ALS, and provides molecular clues to further understand the functional consequences that diseased neurons expressing *CHMP2B* mutant may have on their neighbor cells.

**Key words:** amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia, transcriptomic analysis *CHMP2B<sup>intron5</sup>*, *SOD1<sup>G86R</sup>*, mouse models, inflammation, lipid metabolism, ion transporters.

**Abbreviations:** ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis; AS stage: asymptomatic stage; *CHMP2B*: Charged Multivesicular Body protein 2B; E stage: end stage; FC: fold change; FTD: FrontoTemporal Dementia; nTg: non-transgenic, PAF: platelet activating factor; ROS: reactive oxygen species; SLC: solute carrier family, *SOD1*: superoxide dismutase 1; S stage: symptomatic stage, Tg: transgenic.

## GRAPHICAL ABSTRACT



### Highlights

- Neuronal expression of *CHMP2B<sup>intron5</sup>* in mice alters spinal cord transcriptomic profile.
- Transcriptomic profile evolves with disease progression.
- *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mutant leads to an inflammatory response before appearance of motor symptoms.
- Lipid metabolism is deregulated early in response to *CHMP2B<sup>intron5</sup>* neuronal expression.
- Deregulation of neuron-related genes is associated with motor symptoms.
- *CHMP2B<sup>intron5</sup>* and *SOD1<sup>G86R</sup>* ALS mouse models present common deregulation pathways.

## INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the most common adult-onset motor neuron disease, is characterized by the degeneration of motor neurons associated with progressive muscle denervation and atrophy leading to paralysis and death usually within two to five years following diagnosis (Hand and Rouleau, 2002). Frontotemporal dementia (FTD) is the second most common cause of dementia in people under the age of 65 years after Alzheimer's disease (Ratnavalli et al., 2002). It mainly affects anterior temporal and/or frontal lobes of the brain, causing progressive degeneration of the frontal and temporal cortical neurons and subsequent dementia (Pressman and Miller, 2014).

Although selective groups of neurons are primarily affected in each disease (Lillo and Hodges, 2009) increasing evidence suggests that ALS and FTD may fall into the same disease spectrum (Gascon and Gao, 2014, Ling et al., 2013). ALS and FTD share common pathophysiological features with overlapping genetic causes. Approximately 15-20% of ALS patients present with cognitive impairment reminiscent of FTD and approximately 15% of FTD patients develop ALS (Lillo and Hodges, 2009, Phukan et al., 2012). Therefore, ALS and FTD are now considered overlapping clinical syndromes with common causes. Understanding the common mechanisms and biochemical pathways driving the neurodegenerative processes in these diseases is essential to delineate new therapeutic strategies that could be used for the diseases belonging to this continuum.

Among the genes associated with these two diseases, mutations in the *CHMP2B* (*Charged Multivesicular Body protein 2B*) gene, although rare, are found in patients with ALS (Cox et al., 2010, Parkinson et al., 2006), FTD (Ghanim et al., 2010, Skibinski et al., 2005, van der Zee et al., 2008) and ALS-FTD (Parkinson et al., 2006). CHMP2B is a member of the Charged Multivesicular Body Protein family. These proteins contribute to the ESCRT-III complex (endosomal sorting complex required for transport III), which is involved in endocytic-lysosomal trafficking of proteins and autophagy (Ghazi-Noori et al., 2012, Urwin et al., 2009). From ongoing studies, multiple pathogenic processes have been proposed for CHMP2B mutants: disruption of endo-lysosomal trafficking, misregulation of transmembrane receptors, abnormal substrate degradation, down regulation of a brain-specific microRNA (Gascon et al., 2014) or abnormal dendritic spine morphology (Chassefeyre et al., 2015). However the precise mechanisms leading to disease pathogenesis and progression are still poorly understood. Indeed, ALS and FTD are complex non-cell autonomous multifactorial diseases where both neurons and glia play a critical role in disease progression (Hallmann et al., 2017, Pramatarova et al., 2001, Qian et al., 2017).

Transcriptomic analysis represents a powerful tool to analyze the complexity of disease pathobiology, to shed light on the cascade of events underlying the disease and to identify novel gene targets for therapeutic intervention. Gene expression studies performed on mutant SOD1 ALS mouse models or on tissues from sporadic ALS patients have provided invaluable insights into the molecular

mechanisms involved in ALS, supporting a “multiple-hit” hypothesis of neurodegeneration. In this regard, a number of converging pathogenic mechanisms are known, including oxidative damage, defective protein misfolding, mitochondrial degeneration, impaired axonal transport, neurotrophic factor deficits, apoptosis, aberrant RNA/DNA regulation, and neuroinflammation (Krokidis and Vlamos, 2018). However, little is known about the transcriptional changes associated with *CHMP2B* mutations. In 2010, Cox and collaborators analyzed the transcriptome of motor neurons from 3 ALS patients bearing different *CHMP2B* mutations. They found a distinct gene expression signature with an alteration of pathways related to ER and Golgi function, vesicular transport, mTOR signaling and autophagy, MAPK and calcium signaling, axon guidance, cell cycle and apoptosis, and regulation of actin cytoskeleton. More recently Zhang and collaborators performed a RNAseq analysis on forebrain-type cortical neurons derived from FTD3 patient induced pluripotent stem cells (Zhang et al., 2017). In addition to misregulation of genes related to endolysosomal pathway, mitochondria and oxidative stress, they brought to light an alteration of genes involved in iron homeostasis that may possibly link the previously described alterations. Although giving important information about the mechanisms activated by *CHMP2B* mutants these two studies present important limitations. Indeed, in both cases, the alteration of genomic profiles found are cell-type specific. Thus the obtained results can neither reflect the global changes at a whole tissue level with complex cell-cell interactions, nor the changes of genomic profiles associated with disease progression.

In an attempt to investigate the impact of *CHMP2B*<sup>intron5</sup> neuronal expression in a global context we performed our transcriptomic analyzes from RNA-sequencing on lumbar spinal cord of transgenic *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mouse model. These transgenic mice develop a progressive age-dependent motor phenotype associated with behavioral changes that recapitulate ALS and FTD disorders (Vernay et al., 2016). To gain access to the changes associated with disease progression, gene profiling was performed at three time-points corresponding to asymptomatic, symptomatic and end stage of the disease. In a second step, in an attempt to investigate overlapping alterations in gene expression between two ALS-causing genes, we compared the transcriptome of symptomatic *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mice with the one of *SOD1*<sup>G86R</sup> mice previously published by our laboratory (Henriques et al., 2017).

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Ethics statement**

All animal experimentations were performed in accordance with institutional and national guidelines, and approved by the local ethical committee from Strasbourg University (CREMEAS) and the ministry of higher education and research under numbers; AL/25/32/02/13, AL/51/58/02/13, APAFIS#2255, APAFIS#9494 in accordance with European regulations (Directive 2010/63/EU).

## **Animals**

Transgenic mice overexpressing the human CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant under the Thy1.2 promoter were genotyped as previously described (Vernay et al., 2016). Male CHMP2B<sup>intron5</sup> transgenic (Tg) mice carrying 12 copies of the transgene were compared with control non-transgenic (nTg) littermates. Transgenic mice overexpressing murine SOD1 with the G86R mutation were genotyped as previously described (Ripps et al., 1995).

Mice were group-housed (2–5 per cage) in the animal facility of the medicine faculty of Strasbourg University, in a temperature- and humidity-controlled environment at 22±1 °C under a 12-h light/dark cycle with unrestricted access to regular A04 rodent chow and water.

Mice were studied at three pre-defined stages of disease progression: at 1.5 month of age, an asymptomatic (AS) stage when motor symptoms are absent; at 6 months of age corresponding to the symptomatic (S) stage of the disease when mice develop signs of hindlimb weakness; and at 10 months of age corresponding to the end (E) stage of the disease when mice display hindlimb paralysis or loss of the righting reflex. At the selected time points, mice were sacrificed by lethal injection of pentobarbital (120mg/kg IP). Tissues were carefully dissected and stored at -80° until used.

## **RNA extraction**

Total RNA was prepared following standard protocols. Briefly, each frozen sample was placed into a tube containing a 5-mm stainless steel bead. Working on ice, 1 mL Trizol reagent (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) was added, and homogenization was performed twice in a TissueLyser (Qiagen) at 30 Hz for 3 minutes. Samples for RNA-sequencing analysis were then processed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) according to manufacturer instructions. For RT-qPCR, RNA was extracted with chloroform/isopropyl alcohol/ethanol technic. Samples were stored at -80 °C until use.

## **RNA-sequencing**

RNA-sequencing was performed by the GenomEast platform. Libraries were generated from 500 ng of total RNA using TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit according to Illumina user guide (PN 15031047) with the following modifications: 2 minutes mRNA fragmentation and 12 cycles library PCR amplification. Libraries were then sequenced on an Illumina HiSeq 4000 system using single-end 1x50 bases. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads were mapped onto mm10 assembly of mouse genome using Tophat v2.0.14 (Kim et al., 2013) and bowtie2 v2.1.0 aligner (Langmead and Salzberg, 2012). Quantification of gene expression was performed using HTSeq v0.6.1 (Anders et al., 2015) using gene annotations from Ensembl release 81. Normalization and differential gene expression analysis were performed using R and DESeq2 v1.6.3 Bioconductor library (Love et al., 2014).

## Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA using Iscript reverse transcriptase (iscript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, Bio-Rad) as specified by the manufacturer. Quantitative PCR was performed on a CFX96 Real-time System (Bio-Rad) using iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad). PCR was performed as follow: 95 °C for 30 seconds, followed by 40 cycles of 4 seconds at 95 °C and 4 seconds at 60 °C. Three standard genes (Actin [Acta], Tata-box binding protein [Tbp] and RNA polymerase 2 subunit [Pol II]) were used and data were normalized with GeNorm software v3.5. Primer sequences are given in supplementary table 1.

## Pathway analysis

Gene enrichment analysis was performed by using Gene Ontology and Consensus Pathway Data Base. For these analyses of the CHMP2B<sup>intron5</sup> mice, genes with an adjusted *p*-value lower than 0.05 and a fold change (FC) value  $\leq 0.67$  for down-regulated or  $\geq 1.5$  for up-regulated genes were selected. Pathway over-representation composed of at least 3 genes and with an adjusted *p*-value < 0.05 were considered as significantly altered.

## Statistical analysis

Unless otherwise indicated, data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. GraphPad Prism version 6.0a software was used for statistical analysis. Tests used are indicated in the legends under the figures. Differences with *p*-values of at least < 0.05 were considered significant.

## RESULTS

### **Deregulated genes in the spinal cord of CHMP2B<sup>intron5</sup> mice: transcriptomic analysis discriminate between CHMP2B<sup>intron5</sup> Tg mice and nTg mice at the three stages of the disease.**

To gain insight into the nature and extent of gene expression changes occurring in ALS-FTD syndrome linked to CHMP2B<sup>intron5</sup> mutation, the spinal cord transcriptomes of Tg and age-matched nTg mice were studied by RNA-sequencing at three stages of disease progression: AS stage (1.5 month of age, no motor symptom) S stage (6 months of age, signs of hindlimb weakness) and the E stage of the disease (10 months of age, hindlimb paralysis or loss of the righting reflex).

Principal component analysis (PCA) performed with the 34000 analyzed genes for each stage showed a clear segregation between genotypes at AS and E stages. This segregation was less pronounced at S stage probably reflecting a heterogeneity of disease progression between Tg mice (Figure 1A). As shown in table 1 the number of deregulated genes with an adjusted *p*-value < 0.05 increased with

disease progression. To highlight the most altered cellular processes, a fold change (FC) value  $\leq 0.67$  for down-regulated or  $\geq 1.5$  for up-regulated genes and an adjusted  $p$  value  $<0.05$  were used as criteria for defining a set of deregulated candidate genes in Tg when compared to nTg mice. Using these criteria, unsupervised hierarchical clustering showed that these differentially expressed genes were able to segregate all the Tg mice from their nTg littermates as shown by the dendrograms in Figure 1 B. Comparison of gene expression resulted in 281, 576 and 348 differentially regulated genes at the AS, S and E stage respectively (Figure 1C and table 1). Interestingly, as disease progressed, the percentage of up-regulated genes in Tg mice when compared to nTg littermates was decreased while the percentage of down-regulated genes was increased. Complete list of genes found either up- or down-regulated in Tg when compared to nTg mice are given in Supplementary tables 2-4 (available in the second part of the appendices). Among the deregulated genes identified, 49 were common to the three time points with 19 up-regulated and 30 repressed (Figure 1D). Amongst the repressed genes, 11 were of unknown function.

To ascertain RNA-sequencing results, gene expression was then assessed by RT-qPCR on an independent cohort of mice. For each stage, 10 genes were selected on the basis of their FC. Expression levels of the selected transcripts obtained by RT-qPCR were comparable with the FC found by RNA-seq analysis except for 3 genes, *Hsd11b1* at AS stage and *Unc13* ( $p=0.079$ ) and *Flnc* at ES stage whose regulation did not reach significance (Figure 2).

### **Transcriptomic profiles evolve as disease progress**

In an attempt to identify the mechanisms altered throughout the course of the disease and the pathways with a significant number of differentially expressed genes, gene ontology analysis was performed with significantly dysregulated genes.

At the AS stage, two major pathways emerged as over-represented: the immune system (34% of the deregulated genes; over-representation:  $p_{adj}=2.1e-14$ ) and the metabolism of lipids (9.6% of the deregulated genes, over-representation:  $p_{adj}=1.10e-03$ ). Among the 96 deregulated genes linked to the immune process 32 of them were associated with the inflammatory response (Table 2). Remarkably, except for *Cxcl9* that was down-regulated, the 31 other genes involved in inflammatory response were induced. The most up-regulated proinflammatory and chemo attractant molecules were *Ccl3*, *Ccl4* and *Ccl6* (FC $>3.8$ ), followed by complement subunits *Clqa*, *Clqb*, *Clqc*, *C4b* (FC $>2.2$ ) and *C3* and *C4a* (FC $>1.5$ ) and its receptor *C3ar1* (FC=2.01), and other receptors (*Fcrlg*, *Fcgr1*, *Csflr*, *Ptafr* and *Tlr2*).



In addition, we showed an increase of *Trem2* (FC=3.1) a type I transmembrane protein primarily expressed in microglia in the central nervous system, and of other lectin-related inflammatory proteins such as *Lgals3* (FC=3.39), *Clec7a* (FC=3.06) and the integrin *Itgax* (FC=5).

The second pathway identified as over-represented dealt with the metabolism of lipids (Table 3), a pathway known to be altered in ALS (Dupuis et al., 2008). Indeed, amongst the 281 deregulated genes, 27 genes belong to the lipid metabolism process with 13 genes down-regulated and 14 genes up-regulated. These deregulated genes were involved in plasma lipoprotein assembly, remodeling, and clearance, cholesterol metabolism, synthesis of very long-chain fatty acyl-CoAs and steroids metabolism (Table 3).

Six lipases were deregulated: 60kDa lysophospholipase (*Aspg*: FC=2.19), lipoprotein lipase (*Lpl*: FC=1.9), phospholipase D4 (*Pld4*: FC=1.73), phospholipase B1 (*Plb1*: FC=1.53) endothelial lipase (*Lipg*: FC=0.64) and phospholipase A2 (*Pla2g3*: FC=0.58).

The two apolipoproteins *Apoc1* and *Apoe* were up-regulated with a FC of respectively 2.34 and 1.75 while cubilin (*Cubn*) a protein that mediates high density lipoproteins transport was down-regulated (FC=0.65).

In addition, three enzymes involved in the metabolism of sphingolipids were down regulated: the serine palmitoyltransferase small subunit B (*Sptssb*: FC=0.62), a subunit of serine palmitoyltransferase that catalyzes the first step in the biosynthesis of sphingolipids, the sphingosine-1-phosphate phosphatase 2 (*Sgpp2*: FC=0.65) responsible of sphingosine-1-phosphate synthesis and the 2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase (*Utg8a*: FC=0.65) which catalyzes the synthesis of galactosylceramide from ceramide. Finally, *Hexb*, the beta subunit of hexosaminidase that converts ganglioside GM2 to GM3 was over-expressed (FC=1.52). Four genes involved in steroid metabolism were down-regulated: the corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1 (*Hsd11b1*: FC=0.55) which converts cortisone into corticosterone, 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (*Akr1c4*: FC=0.64) that mediates neurosteroids synthesis, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (*Hmgcs1*: FC=0.66) and isopentenyl-diphosphate delta-isomerase 1 (*Idill*: FC=0.66) that both participate to cholesterol synthesis. Two were up-regulated: testosterone 17-beta-dehydrogenase 3 (*Hsd17b3*: FC=1.75) which converts androstenedione in testosterone and ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3 (*Abcc3*: FC=1.79) which is a multidrug-resistance transporter that mediates efflux of 17-beta-glucuronosyl estradiol and organic cations.

At the S stage (Table 4), when motor impairments are obvious, the mainly altered processes were related to neuronal activity. Indeed, 43 genes associated with this process were deregulated (7.4% of the deregulated genes; over-representation:  $p_{adj}=6.3e-6$ ). Most of them were related to electrical activity of the neuron including potassium and sodium channels, neurotransmitter receptors or transporters and axon guidance. Potassium channels represent the most complex class of voltage-gated

ion channels from both functional and structural standpoints. They play a crucial role in maintaining membrane potential and modulating electrical excitability in neurons. Thirteen potassium channel subunits or potassium channels-related genes were deregulated. *Kcnh4*, *Kcnj4*, *Kcnmb1*, *Kcns1*, *Kcnn1* and *Hcn3* and *Gnb3* mRNAs were up-regulated while *Kcna1*, *Kcna2*, *Kcnc3*, *Kcng4*, *Hcn2* and *Abcc9* mRNAs were repressed. Sodium channels expression was also altered. Voltage-gated sodium channels subunits alpha *Scn9a*, *Scn10a*, *Scn11a* and nicotinic receptor subunits *Chrna6* and *Chrn3* mRNAs were up-regulated. In contrast voltage-gated sodium channel  $\beta$  subunit *Scn4b* and nicotinic receptor alpha2 subunit *Chrna2* mRNAs were repressed. In addition sodium-coupled neurotransmitter transporters were also identified. *Slc17a7* encoding the vesicular glutamate transporter VGLUT1 and *Slc6a12* encoding the GABA transporter GAT2 were up-regulated. At the same time, *Slc6a4* encoding the serotonin transporter SERT and *Slc6a5* encoding the glycine transporter GLYT2 were repressed. In addition, *Slc1a2* (FC=0.72, not included in table 3), encoding the glutamate transporter EAAT2 was also repressed but does not reach our FC threshold. Finally, mRNAs encoding GABA receptor rho2 subunit *Gabbr2* was up regulated while GABA receptor  $\beta$ 2 subunit *Gabbr2* and glycine receptor  $\alpha$ 1 subunit *Glr1* were down regulated in Tg when compared to nTg mice.

At E stage deregulation of neuronal system (4.3% of the deregulated genes, over-representation:  $p_{adj}=0.038$ ) was still present (Table 5). However, the number of deregulated genes was decreased when compared to S stage falling from 43 to 15 genes. Potassium channels family remained the most represented family with 6 out of 15 genes identified. In addition to the neuronal system, a new pathway linked with extracellular matrix emerged (Table 6). In this pathway mRNAs encoding collagens (*Col6a*, *Col9a3*, *Col20a1* and *Col 27a1*) were up-regulated while mRNAs encoding integrins were either up- (*Itgad*, *Itgax*) or down-regulated (*Itga1*, *Itgb3*) and proteoglycans *Acan* and *Hapln* were down-regulated.

In order to determine the genes constantly deregulated during disease progression we then compared the deregulated genes at the three stages studied. 49 genes common to AS, S and E stages were found (Table 7). Twelve were related to the neuronal system (*Chrna2*, *Hspb1*, *Kcnc3*, *Kcnh4*, *Nnat*, *Pdlim4*, *Scn4b*, *Slc6a5*, *Sspo*, *Steap2*, *Strip1*, *Uts2*), 5 were linked with lipid metabolism (*Apoc1*, *Gpd1*, *Hsd11b1*, *Sptssb*, *Ugt8a*), 4 with immune system (*C4a*, *C4b*, *Lgals3*, *Thy1*) and 2 were related with ECM (*Acan*, *Hapln1*). In addition, a new category related to transcription became apparent with the induction of the transcriptional regulators *Atf3*, *Batf3*, *Prrx2* and *Wisp2* and the down-regulation of histone methyl transferase *Smyd1*. Interestingly all the identified genes were either up- or down-regulated over the all three stages.

## **CHMP2B<sup>intron5</sup> and SOD1<sup>G86R</sup> mice share common deregulated genes at symptomatic stage of the disease**

In an attempt to investigate overlapping alterations in gene expression profiles and highlight pathological mechanisms common to two ALS-related mutants, we then compared our results obtained on CHMP2B<sup>intron5</sup> mice at S stage with those of transcriptomic analysis performed on spinal cord from SOD1<sup>G86R</sup> mice at 90 days of age corresponding to the S stage in this line. Using the same criteria than those used for CHMP2B<sup>intron5</sup> model analysis, we found 449 genes deregulated in SOD1<sup>G86R</sup> mice when compared to controls. Among them, 28 were common to both models, with 22 genes up-regulated, 3 genes down-regulated and 3 genes with opposite deregulations. We then categorized these genes and identified 7 deregulated processes (see Table 8 for details). The most represented was the immune system including inflammatory response, followed by molecules involved in transcription, lipid metabolism, neuronal system, repression of translation and cell-cell interactions. Two genes were of unknown function.

## **DISCUSSION**

This work is the first study that thoroughly characterizes the transcriptomic changes that occur throughout the course of disease progression in the spinal cord of an ALS-FTD mouse model. This model is based on the neuronal over-expression of the *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mutant as described earlier (Vernay et al., 2016). Using RNAseq followed by bioinformatic analysis we established that as early as 1.5 month of age, the transcriptomic profile of CHMP2B<sup>intron5</sup> mice showed its own gene expression signature that differs from nTg mice. This demonstrates that transcriptomic changes, confirmed by RT-qPCR on an independent cohort, already exist several weeks before the first clinical motor symptoms. This transcriptomic profile evolves through the course of the disease with a progressive switch of deregulated pathways from immune system/inflammatory response and lipid metabolism to neuronal system dysfunction and ECM alterations when motor symptoms become visible.

*Neuronal expression of CHMP2B<sup>intron5</sup> triggers an initial inflammation with disruption of lipid metabolism before onset of motor symptoms.*

Inflammatory processes are strongly related to ALS and FTD but also to other neurodegenerative disorders like Alzheimer or Parkinson disease. Their role in the development and progression of neurodegenerative diseases is however not clearly understood. Here, we report that neuronal expression of *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mutant triggers a strong activation of immune system associated with an activation of the inflammatory response in spinal cord before any motor symptoms. Indeed, transcripts encoding chemoattractant proteins CCL3, CCL4 and CCL6 that stimulate the recruitment of inflammatory cells (Schulthess et al., 2012) are induced together with an increase of

microglial/macrophage or astrocyte markers (*Aif1/Iba1*; *Cx3cr1*; *Cd68*; *Cd14*; *Cd52*; *Gfap*). In addition expression of IL-1 $\alpha$  and TNF $\alpha$  receptors, which are related to the proinflammatory pathway (Tortarolo et al., 2015), and complement cascade components are also up-regulated. These data are in agreement with data obtained in another transgenic mouse line over-expressing *CHMP2B*<sup>intron5</sup> and in human *CHMP2B* mutation carriers. Indeed, Isaac's group demonstrated the presence of an early microgliosis in brain of *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mice with an up-regulation of mRNAs encoding inflammation markers including *Irf8* and *Csf1r* (Clayton et al., 2017). In human *CHMP2B* mutation carriers, it has recently been shown that serum levels of CCL4 are increased throughout life (Roos et al., 2018). In sporadic ALS patients CCL3, CCL4, IL-1 $\alpha$  are increased in CSF while TNF $\alpha$  receptor levels are increased in plasma. In addition CCL6 is over-expressed in astrocytes from SOD1<sup>G37R</sup> mouse model (Sun et al., 2015) and activation of complement cascade is also observed in SOD1<sup>G93A</sup> mouse model (Ferraiuolo et al., 2007) and in serum of ALS patients (Apostolski et al., 1991). However, depletion of C1q or C3, two essential proteins of complement cascade, does not increase the lifespan of SOD1<sup>G37R</sup> nor delay the degeneration of motor neurons (Lobsiger et al., 2013) suggesting that complement activation is a consequence rather than a cause of disease progression. We also highlight the activation of an inflammatory pathway based on TREM2. TREM2 was previously associated with both ALS pathogenesis (Cady et al., 2014) and microglial activation (Cantoni et al., 2015) and very recently with FTD caused by *CHMP2B* mutants (Roos et al., 2018). TREM2 is a cell surface receptor expressed by microglia, interacting with protein tyrosine kinase binding protein (TYROBP). This apoptotic cell-detector which recognizes a variety of ligands, is able to bind Apolipoprotein E (ApoE) (Bailey et al., 2015) and to promote proinflammatory mechanisms by the induction of inflammatory players (Krasemann et al., 2017). Interestingly, using microarray analysis, Cox and collaborators found that *APOE* is over-expressed in motoneurons of human *CHMP2B* mutation carriers (Cox et al., 2010). Our results show the induction of *Trem2* and its interactor *Tyrobp* associated with an induction of *ApoE* and inflammatory markers including *Clec7a*, *Lgals3*, *Gpnmb* and *Itgax*. Interestingly, *Clec7a* is also over-expressed in astrocytes of SOD1<sup>G93A</sup> ALS mouse model (Baker et al., 2015) while *Itgax* and *ApoE* are increased in microglia (Chiu et al., 2013). However, the exact consequence of TREM pathway activation is a matter of debate. Indeed, recent data also suggest a possible beneficial neuroprotective role of TREM2 by interacting with TLR2 and CD14, which are both induced in our study. Thus, whether TREM2 pathway activation is beneficial or deleterious in our pathological context linked to *CHMP2B*<sup>intron5</sup> neuronal expression remains to be elucidated.

Lipids directly contribute to cell signaling, membrane stability/fluidity and neuronal energy balance during stress. Some recent lipidomic studies point towards a change in lipid metabolism in ALS-FTD patients characterized by an increase of circulating triglycerides level and cholesterol/HDL ratio, a decrease of LDL and APOC1 (Ahmed et al., 2018, Kim et al., 2018, Kim et al., 2018). However little

is known about human *CHMP2B* mutation carriers. Here, we show for the first time that early in the course of the disease, before any motor symptoms, lipid metabolism is significantly altered in *CHMP2B*<sup>intron5</sup> Tg mice. Indeed, expression of several genes encoding proteins involved in plasma lipoprotein formation and clearance, cholesterol metabolism, synthesis of very long chain fatty acids and steroid metabolism is altered. *ApoE* expression is increased as previously found in a transcriptomic analysis of motor neurons from human *CHMP2B* mutation carriers (Cox et al., 2010). However, in an experimental cellular model (IPSC-derived cortical neurons expressing *CHMP2B* mutant) an opposite result was obtained suggesting a potential importance of culture manipulations and conditions or the limits of such models (Zhang et al., 2017). Lipidation of APOE can be performed by ABCA1 a membrane receptor mainly found in the plasma membrane of astrocytes that mediates the efflux of cholesterol and phospholipids to lipid-poor apolipoproteins (Wahrle et al., 2004). In the present transcriptomic analysis *Abca1* expression is also found to be induced (FC=1.41) although not reaching the chosen threshold significance. Nevertheless, this increase of *Abca1* could favor the transport of lipids by APOE to neurons and glia. Associated with these up-regulations of lipids import factors, LPL which hydrolyzes and transports free fatty-acids to neurons and schwann cells (Eckel and Robbins, 1984, Huey et al., 1998) is also induced suggesting an increase of lipids availability for these cells. Of note, gene expression profiling and proteomic analyses reported increased levels of LPL in mutant *SOD1*<sup>G93A</sup> mouse spinal cords. However, in our study other deregulations point toward an inhibition of lipids uptake. Indeed, *Apoc1*, known as an APOE and LPL inhibitor (Berbee et al., 2005) is increased. APOC1 regulates activities of several proteins involved in high density lipoprotein metabolism and its over-expression provokes a hypertriglyceridemia in human and murine plasma composition through the inhibition of LPL activity. This increase of *Apoc1* is also found in the spinal cord of ALS patients, impacting the uptake of lipids by neurons and glial cells (D'Erchia et al., 2017).

The decreased expression of enzymes involved in the synthesis of cholesterol and very long chain fatty acids (*Hmgcs1*, *Idi1*, *Tecrl*, *Elovl2*) could lead to a global reduction of lipids bioavailability. *HMGCS1* was found down regulated in a transcriptomic study performed on spinal cords from ALS patients (D'Erchia et al., 2017). We further observed a decrease of *Cubn* which is involved in the endocytosis of holoparticles of HDL (Hammad et al., 1999).

Finally, sphingolipids are involved in key pathways for ALS, such as autophagy and protein clearance, cell survival, energy metabolism, and neuroinflammation. Our analysis also identified two genes whose deregulation would deregulate the glycosphingolipid pathway: *Ugt8a* and *Hexb*. Interestingly, similar regulations were found in *SOD1*<sup>G86R</sup> mice, and *Ugt8a* expression level correlated with disease severity (Henriques et al., 2017). All these alterations in lipid metabolism may affect the organization of cellular membranes and, in turn, modify axon guidance and synaptic transmission participating to disease progression and neuronal dysfunction.

In our *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mice, at the early stage of the disease, deregulation of the immune system and lipid metabolism are concomitant. Numerous data have already shown that these two processes can be linked by oxidative stress. Indeed, activated microglial cells increase ROS production (Haslund-Vinding et al., 2017, Peterson and Flood, 2012) leading to oxidation of lipids in the plasma membranes of the surrounding cells (de la Haba et al., 2013, Yang et al., 2006). This oxidation of membrane lipids promotes membrane curve disturbance and favors aggregates formation. Moreover, changes in composition of membrane lipids are also known to alter synaptic plasticity and trigger apoptosis (Ledesma et al., 2012). Cutler showed that oxidative stress leads to an increase of ceramide and cholesterol in ALS patients and that inhibition of ceramide and cholesterol synthesis protects against cell death induced by oxidative stress (Cutler et al., 2002). On the other hand, specific class of lipids such as prostaglandins or platelet activating factor (PAF) can also trigger inflammation. In our study, we observed an increased expression of *Pib1* that encodes an enzyme involved in the metabolism of glycerophosphocholine, a precursor of PAF (Edwards and Constantinescu, 2009, Marrache et al., 2002). In addition, *Ptafr*, encoding the PAF receptor expressed on cell surface of microglia (Aihara et al., 2000) is also over-expressed in our transgenic mice suggesting an activation of the PAF pathway.

Altogether, the results obtained at the asymptomatic stage suggest that activation of the immune system represents the initial step of disease onset. One possible cause could be the abnormal accumulation of protein aggregates due to neuronal expression of *CHMP2B*<sup>intron5</sup> that are already detectable at this stage and may trigger the inflammatory response, which then could further participate to neurotoxicity and disease progression. However, activation of immune system and inflammation is not specific to *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mutant and seems to be a general mechanism in ALS, irrespective of the initial cause of the disease, similar activation being also found in sporadic ALS and FTD patients (McCauley and Baloh, 2018, Prado et al., 2018, Roos et al., 2018). The hypothesis of aggregate-causing inflammation has already been proposed for other neurodegenerative diseases. At this stage, the metabolism of lipid is also impacted by *CHMP2B*<sup>intron5</sup> neuronal expression. The emerging question is: which process impact the other? Does the inflammatory response lead to the perturbation of lipid metabolism observed in ALS patients (Schmitt et al., 2014) or the reverse? Another hypothesis could be that proinflammation and lipid metabolism impairment are associated to generate a neurotoxic environment leading to neuronal dysfunction and neuronal death. As recalled above, oxidative stress could be the possible link between inflammation and lipid metabolism.

#### *At the symptomatic and end stages, neuronal functions are deregulated*

One of the characteristic features of ALS is the presence of muscle fasciculations. The origin of fasciculations depends on the functional state of lower motor neurons and is associated with an increase of their excitability (de Carvalho and Swash, 2017, de Carvalho et al., 2017).

A precise balance between neuronal excitation and inhibition is crucial for proper functioning of the nervous system. Disturbance of neuronal excitation-inhibition homeostasis results in severe pathological phenotypes, such as excitotoxic neurodegeneration, epilepsy, muscular spasticity, and mental retardation (Zoghbi et al., 2000). Electrical activity of the neuron and excitability are tightly link to the nature of ion channels expressed by the neuron. This homeostasis relies on the expression of ion channels, neurotransmitter receptors and transporters. So far the only study linking *CHMP2B* mutant to an alteration of neuronal functionality showed that mutant *CHMP2B* elicits a decrease in synaptic activity and suggest that the pathogenic proteins may perturb synaptic plasticity and microstructure, long before overt cell death (Belly et al., 2010). In this study, at symptomatic stage when motor and cognitive symptoms are present in the *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mice, we highlighted a major deregulation of genes implicated in the electrical activity of the neurons (i.e. potassium and sodium channels, neurotransmitter receptors and transporters) potentially leading to a hyperexcitability of the neurons. In support of this hypothesis *Kcna1* and *Kcna2*, that encode Kv1.1 and Kv1.2 alpha subunits voltage-gated potassium channels involved in repolarization and hyperpolarization of neurons by efflux of potassium ions, are down-regulated. *Kcna1* knock-out leads to a hyperexcitability of neurons with a lower excitation threshold without any change in resting potential (Brew et al., 2003) and mice develop seizures (Rho et al., 1999). In ALS patients *Kcna1* and *Kcna2* expression is decreased and correlates with hyperexcitability (Kanai et al., 2006, Kleine et al., 2008, Vucic and Kiernan, 2006), supporting the involvement of these two channels in the disease. In addition, *Scn10* encodes Nav1.8 alpha subunit of a voltage-gated sodium channel that supports repetitive firing in response to sustained depolarization is increased, and gain-of-function mutations of Nav1.8 produce neurons hyperexcitability suggesting that over-expression of *Scn10a* could lead to hyperexcitability (Han et al., 2016). Interestingly, *Scn11a* that encodes the Nav1.9 voltage-gated sodium channel contributing to persistent hyperalgesia following exposure to inflammatory mediators (Huang et al., 2014) is increased in our study and in the transcriptomic study performed on motor neurons from human *CHMP2B* mutation carriers (Cox et al., 2010). As disease progresses, down-regulation of voltage-gated potassium channels persists while deregulation of sodium channels disappears.

We also observed a deregulation of the Slc family of proteins involved in neurotransmitters re-uptake. This deregulation of the Slc family is also observed in motor neurons from human *CHMP2B* carriers (Cox et al., 2010) supporting the results obtained here with our model. In particular, *Slc6a4* involved in the re-uptake of serotonin is decreased, and in the spinal cord serotonin (5-HT) increases motoneuron excitability. Interestingly, the serotonin receptor 3b *Htr3b* is increased. In contrast, *Slc6a5* encoding the glycine transporter 2 (GLYT2) is decreased. It has been shown that in spinal cord of *SOD1*<sup>G93A</sup> ALS mice decreased GLYT2 expression is due to the degeneration of inhibitory interneurons possibly responsible for the hyperexcitability of motor neurons (Hossaini et al., 2011). Further, *Slc6a12* that codes GABA transporter involved in presynaptic GABA re-uptake is increased

thereby possibly stopping GABA effect more rapidly. Moreover, *Slc17a7* that encodes the vesicular glutamate transporter 1 is increased in Cox study and in our study (Cox et al., 2010). Altogether one can hypothesize that the convergence of these deregulations may drive a strong increase in neuronal excitability possibly initiating/participating to subsequent degeneration.

Finally, we also observed altered expression of genes related to extracellular matrix. Deregulation of collagen and integrin expressing genes was also reported in the transcriptomic study performed in motor neurons from human *CHMP2B* carriers (Cox et al., 2010). However, the consequences of these deregulations are not known and need to be further explored.

The comparison of the deregulated genes at the three studied stages of the disease allowed us to identify constantly deregulated genes. Among these genes 49% belong to families or pathways already found deregulated at, at least, one studied stage. Among the remaining genes, one can notice that four transcription factors are commonly up-regulated: *Atf3* whose expression is increased in response to stress, *Batf3* whose expression is involved in dendritic cell differentiation, *Wisp2* that is up-regulated in ganglioside-deficient mice and thought to have a neuroprotective function (Ohkawa et al., 2011) and *Prrx2*. The role of the others deregulated genes in the pathogenesis remains to be elucidated.

Surprisingly, none of the pathways considered as responsible for the pathogenicity of *CHMP2B* mutants (i.e. endo-lysosomal pathway, autophagy) were found statistically over-represented when analyzed with the chosen threshold. This unexpected result may reflect the fact that our analysis was performed on the whole lumbar spinal cord while *CHMP2B<sup>intron5</sup>* expression was restricted to neurons. Nonetheless, considered individually, several genes related to these pathways (i.e. Rab, Atg, or cathepsins family members), were found deregulated strengthening the validity of our approach.

*Comparison of transcriptomic profiles of CHMP2B<sup>intron5</sup> and SOD1<sup>G86R</sup> at symptomatic stage: identification of common new genes possibly involved in pathogenesis, irrespective of the genetic cause of the disease.*

If half of the identified genes common to the two ALS-causing mutants have already been associated with ALS or other neurodegenerative disorders (*AnxA* (Mishra et al., 2007), *Ugt8a* (Sevastou et al., 2016), *Atf3* (Malaspina et al., 2010, *Vlug* et al., 2005), *Bcl3* (Ferry et al., 2014), *Crym* (Daoud et al., 2011, Fukada et al., 2007), *Runx1* (Patel et al., 2011), *Wisp2* (Sevastou et al., 2016), *Calca* (Henriques et al., 2017), *Calcb*, *Cd44* (Matsumoto et al., 2012), *Clic1* (Novarino et al., 2004), *Hcar2* (Wakade et al., 2014), *Spp1* (Morisaki et al., 2016, Yamamoto et al., 2017), *Lgals3* (Yan et al., 2016), *Hspb1* (Fukada et al., 2007, Gorter et al., 2018, Ylikallio et al., 2015)) the remaining genes have not been described as modified or involved in neurodegenerative diseases. However, they are related to physiological functions (immune system, neuronal system, lipid metabolism etc...) known to be altered in neurodegenerative processes and in ALS in particular. Whether the change in expression of



these genes is causative of the pathological process engaged by the two mutants or if it is a consequence has to be determined.

## CONCLUSION

Our study is the first dynamic analysis of transcriptome in a *CHMP2B*<sup>intron5</sup> model, a model developing characteristic hallmarks of ALS/FTD. Our RNA-Seq analysis of lumbar spinal cord provides a snapshot of transcriptomic events characterizing the disease at three different time points giving us an access to the very early changes engaged before motor symptoms become apparent but also to the variations of gene expression profile when motor symptoms become detectable and then when mice are paralyzed. Our results highlight an early deregulation of immune system and lipid metabolism at asymptomatic stage although transgene expression is limited to neurons.

How mutant drives these deregulations remains an open question. Understanding the mechanisms underlying these alterations and determining whether they are protective or deleterious are of prime importance to delineate new therapeutic strategies for these diseases with not cure.

We also show that appearance of motor symptoms correlate with the detectable deregulation of genes related to neuronal system and more specifically with genes involved in ions and neurotransmitters transport. These deregulations may underlie neuronal hyperexcitability that is thought to induce neuronal degeneration in ALS.

Finally the comparison of the gene expression signature of *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mice with those of *SOD1*<sup>G86R</sup> mice at the symptomatic stage provides further insights into common underlying dysfunction of biological pathways, disrupted or disturbed in ALS.

In closing, our study provides a database for neuroscientists to explore potential candidate genes involved in the *CHMP2B*<sup>intron5</sup> -based pathogenesis of ALS, and it may provide molecular clues to further understand the functional consequences that diseased neurons expressing *CHMP2B* mutant may have on their neighbor cells.

## Declaration of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Funding

This work was supported by funds from «Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres Maladies du Motoneurone» (FR), «Association pour la recherche et le développement de moyens de lutte contre les maladies neurodégénératives» (RW), «André Combat la SLA» (JPL), and Région Alsace (RW).

## References

- Ahmed R.M., Highton-Williamson E., Caga J., Thornton N., Ramsey E., Zoing M., Kim W.S., Halliday G.M., Piguet O., Hodges J.R., Farooqi I.S. and Kiernan M.C., 2018. Lipid Metabolism and Survival Across the Frontotemporal Dementia-Amyotrophic Lateral Sclerosis Spectrum: Relationships to Eating Behavior and Cognition. *J Alzheimers Dis.* 61, 773-783. 10.3233/JAD-170660.
- Aihara M., Ishii S., Kume K. and Shimizu T., 2000. Interaction between neurone and microglia mediated by platelet-activating factor. *Genes Cells.* 5, 397-406. 10.1046/j.1365-2443.2000.00333.x
- Anders S., Pyl P.T. and Huber W., 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 31, 166-9. 10.1093/bioinformatics/btu638.
- Apostolski S., Nikolic J., Bugarski-Prokopljjevic C., Miletic V., Pavlovic S. and Filipovic S., 1991. Serum and CSF immunological findings in ALS. *Acta Neurol Scand.* 83, 96-8. 10.1046/j.1365-2443.2000.00333.x
- Bailey C.C., DeVaux L.B. and Farzan M., 2015. The Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 Binds Apolipoprotein E. *J Biol Chem.* 290, 26033-42. 10.1074/jbc.M115.677286.
- Baker D.J., Blackburn D.J., Keatinge M., Sokhi D., Viskaitis P., Heath P.R., Ferraiuolo L., Kirby J. and Shaw P.J., 2015. Lysosomal and phagocytic activity is increased in astrocytes during disease progression in the SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 9, 410. 10.3389/fncel.2015.00410.
- Belly A., Bodon G., Blot B., Bouron A., Sadoul R. and Goldberg Y., 2010. CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J Cell Sci.* 123, 2943-54. 10.1242/jcs.068817.
- Berbee J.F., van der Hoogt C.C., Sundararaman D., Havekes L.M. and Rensen P.C., 2005. Severe hypertriglyceridemia in human APOC1 transgenic mice is caused by apoC-I-induced inhibition of LPL. *J Lipid Res.* 46, 297-306. 10.1194/jlr.M400301-JLR200.

Brew H.M., Hallows J.L. and Tempel B.L., 2003. Hyperexcitability and reduced low threshold potassium currents in auditory neurons of mice lacking the channel subunit Kv1.1. *J Physiol.* 548, 1-20. 10.1113/jphysiol.2002.035568.

Cady J., Koval E.D., Benitez B.A., Zaidman C., Jockel-Balsarotti J., Allred P., Baloh R.H., Ravits J., Simpson E., Appel S.H., Pestronk A., Goate A.M., Miller T.M., Cruchaga C. and Harms M.B., 2014. TREM2 variant p.R47H as a risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol.* 71, 449-53. 10.1001/jamaneurol.2013.6237.

Cantoni C., Bollman B., Licastro D., Xie M., Mikesell R., Schmidt R., Yuede C.M., Galimberti D., Olivecrona G., Klein R.S., Cross A.H., Otero K. and Piccio L., 2015. TREM2 regulates microglial cell activation in response to demyelination in vivo. *Acta Neuropathol.* 129, 429-47. 10.1007/s00401-015-1388-1.

Chassefeyre R., Martinez-Hernandez J., Bertaso F., Bouquier N., Blot B., Laporte M., Fraboulet S., Coute Y., Devoy A., Isaacs A.M., Pernet-Gallay K., Sadoul R., Fagni L. and Goldberg Y., 2015. Regulation of postsynaptic function by the dementia-related ESCRT-III subunit CHMP2B. *J Neurosci.* 35, 3155-73. 10.1523/JNEUROSCI.0586-14.2015.

Chiu I.M., Morimoto E.T., Goodarzi H., Liao J.T., O'Keefe S., Phatnani H.P., Muratet M., Carroll M.C., Levy S., Tavazoie S., Myers R.M. and Maniatis T., 2013. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep.* 4, 385-401. 10.1016/j.celrep.2013.06.018.

Clayton E.L., Mancuso R., Nielsen T.T., Mizielinska S., Holmes H., Powell N., Norona F., Larsen J.O., Milioto C., Wilson K.M., Lythgoe M.F., Ourselin S., Nielsen J.E., Johannsen P., Holm I., Collinge J., FreJa, Oliver P.L., Gomez-Nicola D. and Isaacs A.M., 2017. Early microgliosis precedes neuronal loss and behavioural impairment in mice with a frontotemporal dementia-causing CHMP2B mutation. *Hum Mol Genet.* 26, 873-887. 10.1093/hmg/ddx003.

Cox L.E., Ferraiuolo L., Goodall E.F., Heath P.R., Higginbottom A., Mortiboys H., Hollinger H.C., Hartley J.A., Brockington A., Burness C.E., Morrison K.E., Wharton S.B., Grierson A.J., Ince P.G., Kirby J. and Shaw P.J., 2010. Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One.* 5, e9872. 10.1371/journal.pone.0009872.

Cutler R.G., Pedersen W.A., Camandola S., Rothstein J.D. and Mattson M.P., 2002. Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 52, 448-57. 10.1002/ana.10312.

D'Erchia A.M., Gallo A., Manzari C., Raho S., Horner D.S., Chiara M., Valletti A., Aiello I., Mastropasqua F., Ciaccia L., Locatelli F., Pisani F., Nicchia G.P., Svelto M., Pesole G. and Picardi E.,

2017. Massive transcriptome sequencing of human spinal cord tissues provides new insights into motor neuron degeneration in ALS. *Sci Rep.* 7, 10046. 10.1038/s41598-017-10488-7.

Daoud H., Valdmanis P.N., Gros-Louis F., Belzil V., Spiegelman D., Henrion E., Diallo O., Desjarlais A., Gauthier J., Camu W., Dion P.A. and Rouleau G.A., 2011. Resequencing of 29 candidate genes in patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 68, 587-93. 10.1001/archneurol.2010.351.

de Carvalho M. and Swash M., 2017. Physiology of the fasciculation potentials in amyotrophic lateral sclerosis: which motor units fasciculate? *J Physiol Sci.* 67, 569-576. 10.1007/s12576-016-0484-x.

de Carvalho M., Kiernan M.C. and Swash M., 2017. Fasciculation in amyotrophic lateral sclerosis: origin and pathophysiological relevance. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 88, 773-779. 10.1136/jnnp-2017-315574.

de la Haba C., Palacio J.R., Martinez P. and Morros A., 2013. Effect of oxidative stress on plasma membrane fluidity of THP-1 induced macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1828, 357-64. 10.1016/j.bbamem.2012.08.013.

Dupuis L., Corcia P., Fergani A., Gonzalez De Aguilar J.L., Bonnefont-Rousselot D., Bittar R., Seilhean D., Hauw J.J., Lacomblez L., Loeffler J.P. and Meininger V., 2008. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 70, 1004-9. 10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27.

Eckel R.H. and Robbins R.J., 1984. Lipoprotein lipase is produced, regulated, and functional in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 7604-7.

Edwards L.J. and Constantinescu C.S., 2009. Platelet activating factor/platelet activating factor receptor pathway as a potential therapeutic target in autoimmune diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 8, 182-90. 10.2174/187152809788681010.

Ferraiuolo L., Heath P.R., Holden H., Kasher P., Kirby J. and Shaw P.J., 2007. Microarray analysis of the cellular pathways involved in the adaptation to and progression of motor neuron injury in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J Neurosci.* 27, 9201-19. 10.1523/JNEUROSCI.1470-07.2007.

Ferry A., Joanne P., Hadj-Said W., Vignaud A., Lilienbaum A., Hourde C., Medja F., Noirez P., Charbonnier F., Chatonnet A., Chevessier F., Nicole S., Agbulut O. and Butler-Browne G., 2014. Advances in the understanding of skeletal muscle weakness in murine models of diseases affecting nerve-evoked muscle activity, motor neurons, synapses and myofibers. *Neuromuscul Disord.* 24, 960-72. 10.1016/j.nmd.2014.06.001.

- Fukada Y., Yasui K., Kitayama M., Doi K., Nakano T., Watanabe Y. and Nakashima K., 2007. Gene expression analysis of the murine model of amyotrophic lateral sclerosis: studies of the Leu126delTT mutation in SOD1. *Brain Res.* 1160, 1-10. 10.1016/j.brainres.2007.05.044.
- Gascon E. and Gao F.B., 2014. The emerging roles of microRNAs in the pathogenesis of frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis (FTD-ALS) spectrum disorders. *J Neurogenet.* 28, 30-40. 10.3109/01677063.2013.876021.
- Gascon E., Lynch K., Ruan H., Almeida S., Verheyden J.M., Seeley W.W., Dickson D.W., Petrucelli L., Sun D., Jiao J., Zhou H., Jakovcevski M., Akbarian S., Yao W.D. and Gao F.B., 2014. Alterations in microRNA-124 and AMPA receptors contribute to social behavioral deficits in frontotemporal dementia. *Nat Med.* 20, 1444-51. 10.1038/nm.3717.
- Ghanim M., Guillot-Noel L., Pasquier F., Jornea L., Deramecourt V., Dubois B., Le Ber I., Brice A., French Research Network on F.T.D. and Ftd/Mnd, 2010. CHMP2B mutations are rare in French families with frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol.* 257, 2032-6. 10.1007/s00415-010-5655-8.
- Ghazi-Noori S., Froud K.E., Mizielinska S., Powell C., Smidak M., Fernandez de Marco M., O'Malley C., Farmer M., Parkinson N., Fisher E.M., Asante E.A., Brandner S., Collinge J. and Isaacs A.M., 2012. Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain.* 135, 819-32. 10.1093/brain/aws006.
- Gorter R.P., Stephenson J., Nutma E., Anink J., de Jonge J.C., Baron W., Jahrebeta M.C., Belien J.A.M., van Noort J.M., Mijnsbergen C., Aronica E. and Amor S., 2018. Rapidly progressive amyotrophic lateral sclerosis is associated with microglial reactivity and small heat shock protein expression in reactive astrocytes. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 10.1111/nan.12525.
- Hallmann A.L., Arauzo-Bravo M.J., Mavrommatis L., Ehrlich M., Ropke A., Brockhaus J., Missler M., Sternecker J., Scholer H.R., Kuhlmann T., Zaehres H. and Hargus G., 2017. Astrocyte pathology in a human neural stem cell model of frontotemporal dementia caused by mutant TAU protein. *Sci Rep.* 7, 42991. 10.1038/srep42991.
- Hammad S.M., Stefansson S., Twal W.O., Drake C.J., Fleming P., Remaley A., Brewer H.B., Jr. and Argraves W.S., 1999. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 10158-63.
- Han C., Huang J. and Waxman S.G., 2016. Sodium channel Nav1.8: Emerging links to human disease. *Neurology.* 86, 473-83. 10.1212/WNL.0000000000002333.
- Hand C.K. and Rouleau G.A., 2002. Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 25, 135-59.

- Haslund-Vinding J., McBean G., Jaquet V. and Vilhardt F., 2017. NADPH oxidases in oxidant production by microglia: activating receptors, pharmacology and association with disease. *Br J Pharmacol.* 174, 1733-1749. 10.1111/bph.13425.
- Henriques A., Croixmarie V., Bouscary A., Mosbach A., Keime C., Boursier-Neyret C., Walter B., Spedding M. and Loeffler J.P., 2017. Sphingolipid Metabolism Is Dysregulated at Transcriptomic and Metabolic Levels in the Spinal Cord of an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci.* 10, 433. 10.3389/fnmol.2017.00433.
- Henriques A., Huebecker M., Blasco H., Keime C., Andres C.R., Corcia P., Priestman D.A., Platt F.M., Spedding M. and Loeffler J.P., 2017. Inhibition of beta-Glucocerebrosidase Activity Preserves Motor Unit Integrity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Rep.* 7, 5235. 10.1038/s41598-017-05313-0.
- Hossaini M., Cardona Cano S., van Dis V., Haasdijk E.D., Hoogenraad C.C., Holstege J.C. and Jaarsma D., 2011. Spinal inhibitory interneuron pathology follows motor neuron degeneration independent of glial mutant superoxide dismutase 1 expression in SOD1-ALS mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 70, 662-77. 10.1097/NEN.0b013e31822581ac.
- Huang J., Han C., Estacion M., Vasylyev D., Hoeijmakers J.G., Gerrits M.M., Tyrrell L., Lauria G., Faber C.G., Dib-Hajj S.D., Merkies I.S., Waxman S.G. and Group P.S., 2014. Gain-of-function mutations in sodium channel Na(v)1.9 in painful neuropathy. *Brain.* 137, 1627-42. 10.1093/brain/awu079.
- Huey P.U., Marcell T., Owens G.C., Etienne J. and Eckel R.H., 1998. Lipoprotein lipase is expressed in cultured Schwann cells and functions in lipid synthesis and utilization. *J Lipid Res.* 39, 2135-42.
- Kanai K., Kuwabara S., Misawa S., Tamura N., Ogawara K., Nakata M., Sawai S., Hattori T. and Bostock H., 2006. Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain.* 129, 953-62. 10.1093/brain/awl024.
- Kim D., Pertea G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R. and Salzberg S.L., 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14, R36. 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- Kim W.S., He Y., Phan K., Ahmed R.M., Rye K.A., Piguet O., Hodges J.R. and Halliday G.M., 2018. Altered High Density Lipoprotein Composition in Behavioral Variant Frontotemporal Dementia. *Front Neurosci.* 12, 847. 10.3389/fnins.2018.00847.
- Kim W.S., Jary E., Pickford R., He Y., Ahmed R.M., Piguet O., Hodges J.R. and Halliday G.M., 2018. Lipidomics Analysis of Behavioral Variant Frontotemporal Dementia: A Scope for Biomarker Development. *Front Neurol.* 9, 104. 10.3389/fneur.2018.00104.

- Kleine B.U., Stegeman D.F., Schelhaas H.J. and Zwarts M.J., 2008. Firing pattern of fasciculations in ALS: evidence for axonal and neuronal origin. *Neurology*. 70, 353-9. 10.1212/01.wnl.0000300559.14806.2a.
- Krasemann S., Madore C., Cialic R., Baufeld C., Calcagno N., El Fatimy R., Beckers L., O'Loughlin E., Xu Y., Fanek Z., Greco D.J., Smith S.T., Tweet G., Humulock Z., Zrzavy T., Conde-Sanroman P., Gacias M., Weng Z., Chen H., Tjon E., Mazaheri F., Hartmann K., Madi A., Ulrich J.D., Glatzel M., Worthmann A., Heeren J., Budnik B., Lemere C., Ikezu T., Heppner F.L., Litvak V., Holtzman D.M., Lassmann H., Weiner H.L., Ochando J., Haass C. and Butovsky O., 2017. The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*. 47, 566-581 e9. 10.1016/j.immuni.2017.08.008.
- Krokidis M.G. and Vlamos P., 2018. Transcriptomics in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 10, 103-121.
- Langmead B. and Salzberg S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 9, 357-9. 10.1038/nmeth.1923.
- Ledesma M.D., Martin M.G. and Dotti C.G., 2012. Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog Lipid Res*. 51, 23-35. 10.1016/j.plipres.2011.11.004.
- Lillo P. and Hodges J.R., 2009. Frontotemporal dementia and motor neurone disease: overlapping clinic-pathological disorders. *J Clin Neurosci*. 16, 1131-5. 10.1016/j.jocn.2009.03.005.
- Ling S.C., Polymenidou M. and Cleveland D.W., 2013. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*. 79, 416-38. 10.1016/j.neuron.2013.07.033.
- Lobsiger C.S., Boillee S., Pozniak C., Khan A.M., McAlonis-Downes M., Lewcock J.W. and Cleveland D.W., 2013. C1q induction and global complement pathway activation do not contribute to ALS toxicity in mutant SOD1 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110, E4385-92. 10.1073/pnas.1318309110.
- Love M.I., Huber W. and Anders S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 15, 550. 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Malaspina A., Ngoh S.F., Ward R.E., Hall J.C., Tai F.W., Yip P.K., Jones C., Jokic N., Averill S.A., Michael-Titus A.T. and Priestley J.V., 2010. Activation transcription factor-3 activation and the development of spinal cord degeneration in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience*. 169, 812-27. 10.1016/j.neuroscience.2010.04.053.
- Marrache A.M., Gobeil F., Jr., Bernier S.G., Stankova J., Rola-Pleszczynski M., Choufani S., Bkaily G., Bourdeau A., Sirois M.G., Vazquez-Tello A., Fan L., Joyal J.S., Filep J.G., Varma D.R., Ribeiro-

Da-Silva A. and Chemtob S., 2002. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol.* 169, 6474-81. 10.4049/jimmunol.169.11.6474.

Matsumoto T., Imagama S., Hirano K., Ohgomori T., Natori T., Kobayashi K., Muramoto A., Ishiguro N. and Kadomatsu K., 2012. CD44 expression in astrocytes and microglia is associated with ALS progression in a mouse model. *Neurosci Lett.* 520, 115-20. 10.1016/j.neulet.2012.05.048.

McCauley M.E. and Baloh R.H., 2018. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 10.1007/s00401-018-1933-9.

Mishra M., Paunesku T., Woloschak G.E., Siddique T., Zhu L.J., Lin S., Greco K. and Bigio E.H., 2007. Gene expression analysis of frontotemporal lobar degeneration of the motor neuron disease type with ubiquitinated inclusions. *Acta Neuropathol.* 114, 81-94. 10.1007/s00401-007-0240-7.

Morisaki Y., Niikura M., Watanabe M., Onishi K., Tanabe S., Moriwaki Y., Okuda T., Ohara S., Murayama S., Takao M., Uchida S., Yamanaka K. and Misawa H., 2016. Selective Expression of Osteopontin in ALS-resistant Motor Neurons is a Critical Determinant of Late Phase Neurodegeneration Mediated by Matrix Metalloproteinase-9. *Sci Rep.* 6, 27354. 10.1038/srep27354.

Novarino G., Fabrizi C., Tonini R., Denti M.A., Malchiodi-Albedi F., Lauro G.M., Sacchetti B., Paradisi S., Ferroni A., Curmi P.M., Breit S.N. and Mazzanti M., 2004. Involvement of the intracellular ion channel CLIC1 in microglia-mediated beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Neurosci.* 24, 5322-30. 10.1523/JNEUROSCI.1170-04.2004.

Ohkawa Y., Ohmi Y., Tajima O., Yamauchi Y., Furukawa K. and Furukawa K., 2011. Wisp2/CCN5 up-regulated in the central nervous system of GM3-only mice facilitates neurite formation in Neuro2a cells via integrin-Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 411, 483-9. 10.1016/j.bbrc.2011.06.118.

Parkinson N., Ince P.G., Smith M.O., Highley R., Skibinski G., Andersen P.M., Morrison K.E., Pall H.S., Hardiman O., Collinge J., Shaw P.J., Fisher E.M., Study M.R.C.P.i.A. and Consortium F.R., 2006. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology.* 67, 1074-7. 10.1212/01.wnl.0000231510.89311.8b.

Patel A., Rees S.D., Kelly M.A., Bain S.C., Barnett A.H., Thalitaya D. and Prasher V.P., 2011. Association of variants within APOE, SORL1, RUNX1, BACE1 and ALDH18A1 with dementia in Alzheimer's disease in subjects with Down syndrome. *Neurosci Lett.* 487, 144-8. 10.1016/j.neulet.2010.10.010.

Peterson L.J. and Flood P.M., 2012. Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.* 2012, 401264. 10.1155/2012/401264.



Phukan J., Elamin M., Bede P., Jordan N., Gallagher L., Byrne S., Lynch C., Pender N. and Hardiman O., 2012. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 83, 102-8. 10.1136/jnnp-2011-300188.

Prado L.G.R., Rocha N.P., de Souza L.C., Bicalho I.C.S., Gomez R.S., Vidigal-Lopes M., Braz N.F.T., Vieira E.L.M. and Teixeira A.L., 2018. Longitudinal assessment of clinical and inflammatory markers in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 394, 69-74. 10.1016/j.jns.2018.08.033.

Pramatarova A., Laganieri J., Roussel J., Brisebois K. and Rouleau G.A., 2001. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci*. 21, 3369-74. 10.1523/JNEUROSCI.21-10-03369.2001.

Pressman P.S. and Miller B.L., 2014. Diagnosis and management of behavioral variant frontotemporal dementia. *Biol Psychiatry*. 75, 574-81. 10.1016/j.biopsych.2013.11.006.

Qian K., Huang H., Peterson A., Hu B., Maragakis N.J., Ming G.L., Chen H. and Zhang S.C., 2017. Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports*. 8, 843-855. 10.1016/j.stemcr.2017.03.003.

Ratnavalli E., Brayne C., Dawson K. and Hodges J.R., 2002. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*. 58, 1615-21. 10.1212/WNL.58.11.1615.

Rho J.M., Szot P., Tempel B.L. and Schwartzkroin P.A., 1999. Developmental seizure susceptibility of kv1.1 potassium channel knockout mice. *Dev Neurosci*. 21, 320-7. 10.1159/000017381.

Ripps M.E., Huntley G.W., Hof P.R., Morrison J.H. and Gordon J.W., 1995. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92, 689-93.

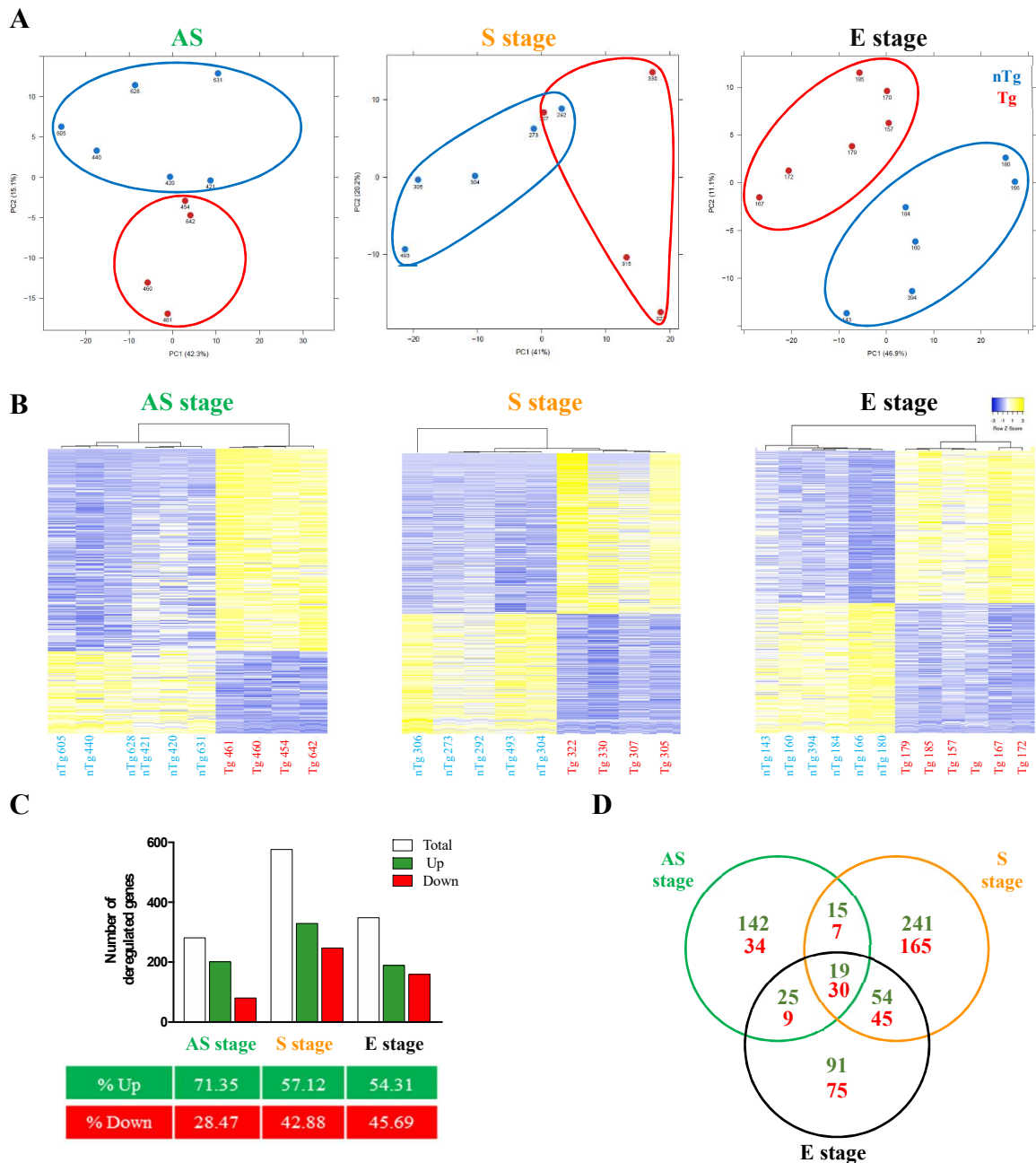
Roos P., von Essen M.R., Nielsen T.T., Johannsen P., Stokholm J., Bie A.S., Waldemar G., Simonsen A.H., Heslegrave A., Zetterberg H., consortium F.R., Sellebjerg F. and Nielsen J.E., 2018. Inflammatory markers of CHMP2B-mediated frontotemporal dementia. *J Neuroimmunol*. 324, 136-142. 10.1016/j.jneuroim.2018.08.009.

Schmitt F., Hussain G., Dupuis L., Loeffler J.P. and Henriques A., 2014. A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. *Front Cell Neurosci*. 8, 25. 10.3389/fncel.2014.00025.

Schulthess J., Meresse B., Ramiro-Puig E., Montcuquet N., Darche S., Begue B., Ruemmele F., Combadiere C., Di Santo J.P., Buzoni-Gatel D. and Cerf-Bensussan N., 2012. Interleukin-15-dependent NKp46+ innate lymphoid cells control intestinal inflammation by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity*. 37, 108-21. 10.1016/j.immuni.2012.05.013.

- Sevastou I., Pryce G., Baker D. and Selwood D.L., 2016. Characterisation of Transcriptional Changes in the Spinal Cord of the Progressive Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Biozzi ABH Mouse Model by RNA Sequencing. *PLoS One*. 11, e0157754. 10.1371/journal.pone.0157754.
- Skibinski G., Parkinson N.J., Brown J.M., Chakrabarti L., Lloyd S.L., Hummerich H., Nielsen J.E., Hodges J.R., Spillantini M.G., Thusgaard T., Brandner S., Brun A., Rossor M.N., Gade A., Johannsen P., Sorensen S.A., Gydesen S., Fisher E.M. and Collinge J., 2005. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet*. 37, 806-8. 10.1038/ng1609.
- Sun S., Sun Y., Ling S.C., Ferraiuolo L., McAlonis-Downes M., Zou Y., Drenner K., Wang Y., Ditsworth D., Tokunaga S., Kopelevich A., Kaspar B.K., Lagier-Tourenne C. and Cleveland D.W., 2015. Translational profiling identifies a cascade of damage initiated in motor neurons and spreading to glia in mutant SOD1-mediated ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112, E6993-7002. 10.1073/pnas.1520639112.
- Tortarolo M., Vallarola A., Lidonnici D., Battaglia E., Gensano F., Spaltro G., Fiordaliso F., Corbelli A., Garetto S., Martini E., Pasetto L., Kallikourdis M., Bonetto V. and Bendotti C., 2015. Lack of TNF-alpha receptor type 2 protects motor neurons in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis and in mutant SOD1 mice but does not affect disease progression. *J Neurochem*. 135, 109-24. 10.1111/jnc.13154.
- Urwin H., Ghazi-Noori S., Collinge J. and Isaacs A., 2009. The role of CHMP2B in frontotemporal dementia. *Biochem Soc Trans*. 37, 208-12. 10.1042/BST0370208.
- van der Zee J., Urwin H., Engelborghs S., Bruyland M., Vandenberghe R., Dermaut B., De Pooter T., Peeters K., Santens P., De Deyn P.P., Fisher E.M., Collinge J., Isaacs A.M. and Van Broeckhoven C., 2008. CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Hum Mol Genet*. 17, 313-22. 10.1093/hmg/ddm309.
- Vernay A., Therreau L., Blot B., Risson V., Dirrig-Grosch S., Waegaert R., Lequeu T., Sellal F., Schaeffer L., Sadoul R., Loeffler J.P. and Rene F., 2016. A transgenic mouse expressing CHMP2Bintron5 mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet*. 25, 3341-3360. 10.1093/hmg/ddw182.
- Vlug A.S., Teuling E., Haasdijk E.D., French P., Hoogenraad C.C. and Jaarsma D., 2005. ATF3 expression precedes death of spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis-SOD1 transgenic mice and correlates with c-Jun phosphorylation, CHOP expression, somato-dendritic ubiquitination and Golgi fragmentation. *Eur J Neurosci*. 22, 1881-94. 10.1111/j.1460-9568.2005.04389.x.

- Vucic S. and Kiernan M.C., 2006. Novel threshold tracking techniques suggest that cortical hyperexcitability is an early feature of motor neuron disease. *Brain*. 129, 2436-46. 10.1093/brain/awl1172.
- Wahrle S.E., Jiang H., Parsadanian M., Legleiter J., Han X., Fryer J.D., Kowalewski T. and Holtzman D.M., 2004. ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem*. 279, 40987-93. 10.1074/jbc.M407963200.
- Wakade C., Chong R., Bradley E., Thomas B. and Morgan J., 2014. Upregulation of GPR109A in Parkinson's disease. *PLoS One*. 9, e109818. 10.1371/journal.pone.0109818.
- Yamamoto T., Murayama S., Takao M., Isa T. and Higo N., 2017. Expression of secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) in human sensorimotor cortex and spinal cord: Changes in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*. 1655, 168-175. 10.1016/j.brainres.2016.10.030.
- Yan J., Xu Y., Zhang L., Zhao H., Jin L., Liu W.G., Weng L.H., Li Z.H. and Chen L., 2016. Increased Expressions of Plasma Galectin-3 in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Chin Med J (Engl)*. 129, 2797-2803. 10.4103/0366-6999.194656.
- Yang B., Oo T.N. and Rizzo V., 2006. Lipid rafts mediate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro-survival effects in cultured endothelial cells. *FASEB J*. 20, 1501-3. 10.1096/fj.05-5359fje.
- Ylikallio E., Konovalova S., Dhungana Y., Hilander T., Junna N., Partanen J.V., Toppila J.P., Auranen M. and Tyynismaa H., 2015. Truncated HSPB1 causes axonal neuropathy and impairs tolerance to unfolded protein stress. *BBA Clin*. 3, 233-42. 10.1016/j.bbacli.2015.03.002.
- Zhang Y., Schmid B., Nikolaisen N.K., Rasmussen M.A., Aldana B.I., Agger M., Calloe K., Stummann T.C., Larsen H.M., Nielsen T.T., Huang J., Xu F., Liu X., Bolund L., Meyer M., Bak L.K., Waagepetersen H.S., Luo Y., Nielsen J.E., Consortium F.R., Holst B., Clausen C., Hyttel P. and Freude K.K., 2017. Patient iPSC-Derived Neurons for Disease Modeling of Frontotemporal Dementia with Mutation in CHMP2B. *Stem Cell Reports*. 8, 648-658. 10.1016/j.stemcr.2017.01.012.
- Zoghbi H.Y., Gage F.H. and Choi D.W., 2000. Neurobiology of disease. *Curr Opin Neurobiol*. 10, 655-60. 10.1016/S0959-4388(00)00135-5.



**Figure 1: Evolution of spinal cord transcriptomic signature in  $CHMP2B^{intron5}$  mice with disease progression.**

Gene expression profiles of  $CHMP2B^{intron5}$  mice (Tg) were compared to non transgenic littermate mice (nTg) at three stages of the disease: asymptomatic (AS), symptomatic (S) and end (E) stages.

**A.** Unsupervised principal component analysis (PCA) performed with the whole set of genes identified by RNAseq. Tg mice are in red and nTg mice are in blue. PCA show a complete separation between genotypes at AS and E stages.

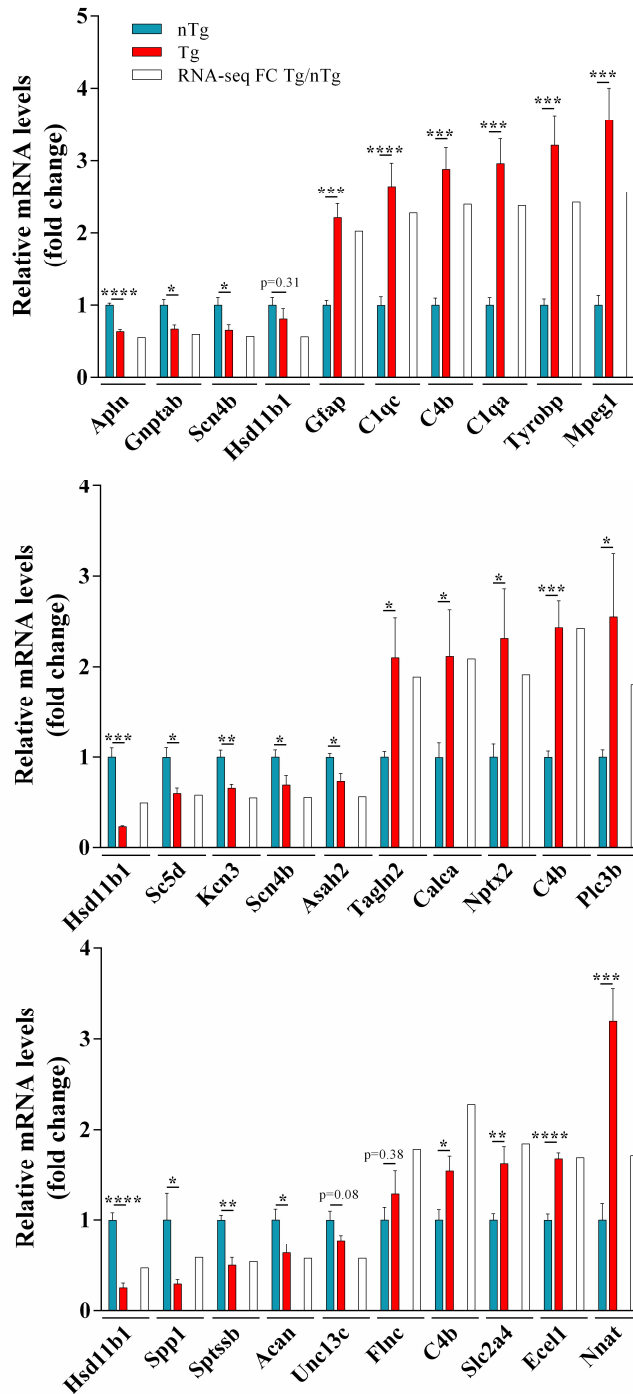
**B.** Heatmap and hierarchical clustering analysis profiles of Tg and nTg mice at the three stages. Genes differentially expressed with an adjusted  $p$ -value < 0.05 were analyzed. Scaled expression values are coloured-code according to the legend on the top right. Dendrograms depict hierarchical clustering based on differentially expressed genes and show a complete separation between genotypes at the three stages of the disease.

**C.** The histograms tabulate the distribution of genes with altered expression at the three stages. Genes differentially expressed with an adjusted  $p$ -value < 0.05 and a fold change < 0.67 or > 1.5 were included

for the analysis. White bar: total number of genes with deregulated expression, green bar: up-regulated genes, red bar: down-regulated genes. The table represents the percentage of up- and down-regulated genes for each stage.

**D.** Venn diagram summarizing gene overlapping between the 3 stages. Genes differentially expressed with an adjusted  $p$ -value  $<0.05$  and a fold change  $<0.67$  or  $>1.5$  were included in the analysis. In green: up-regulated genes, in red: down-regulated genes.

nTg: non transgenic mice; Tg: CHMP2B<sup>intron5</sup> transgenic mice



**Figure 2: qPCR validation of RNA-seq results.**

For each stage, asymptomatic (A), symptomatic (B) and end stage (C) expression of 10 genes either up- or down-regulated in the RNAseq analysis was measured by RT-qPCR. For qPCR results, graphs represent means  $\pm$  SEM. For RNAseq, graph represent the fold change (FC).

qPCR: n = 6-7 per genotype; RNAseq: n=4-6 per genotype. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , Student's t-test.

Stage \ Cut-off	Number of significantly deregulated genes	
	P<0.05	P<0.05 FC $\leq$ 0.67 or $\geq$ 1.5
Asymptomatic (1.5 month)	1063	281
Symptomatic (6 months)	2809	576
End-stage (10 months)	4404	348

**Table 1: Summary of the number of deregulated genes with the different cut-off applied.**

Gene name	Description	Fold Change	Adjusted p-value	Inflammation	Complement coagulation cascade	Macrophage markers
<i>Aif1</i>	Allograft inflammatory factor 1	1.64	5.2e-06	↑		
<i>Arl11</i>	ADP-ribosylation factor-like protein 11	2.84	1.9e-15			
<i>Batf3</i>	Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3	1.89	2.6e-04			
<i>Bcl3</i>	B-cell lymphoma 3 protein homolog	1.64	1.2e-02			
<i>Blnk</i>	B-cell linker protein	1.72	1.3e-05			
<i>Clqa</i>	Complement C1q subcomponent subunit A	2.38	4.7e-10		↑	
<i>Clqb</i>	Complement C1q subcomponent subunit B	2.21	1.7e-12		↑	
<i>Clqc</i>	Complement component 1, q subcomponent, C chain	2.28	9.8e-10		↑	
<i>C3</i>	Complement component 3	1.80	1.5e-09	↑	↑	
<i>C3ar1</i>	Complement component 3a receptor 1	2.01	5.7e-06	↑	↑	
<i>C4a</i>	Complement component 4A	1.56	1.49e-03	↑	↑	
<i>C4b</i>	Complement component 4B	2.39	2.7e-21		↑	
<i>Ccl3</i>	C-C motif chemokine 3	3.82	2.3e-16	↑		
<i>Ccl4</i>	C-C motif chemokine 4	3.82	2.3e-16	↑		
<i>Ccl6</i>	C-C motif chemokine 6	4.60	1.2e-22	↑		
<i>Cd109</i>	CD109 antigen	2.23	7.3e-10			
<i>Cd14</i>	CD14 antigen	1.97	3.0e-07	↑		↑
<i>Cd180</i>	CD180 antigen	2.02	1.1e-06	↑		
<i>Cd22</i>	CD22 antigen	1.61	1.8e-02			
<i>Cd300lb</i>	CD300 molecule like family member B	1.74	5.3e-03			
<i>Cd44</i>	CD44 antigen	1.57	2.7e-03	↑		
<i>Cd48</i>	CD48 antigen	1.72	4.6e-04			
<i>Cd52</i>	CD52 antigen	1.80	5.7e-04			↑
<i>Cd68</i>	CD68 antigen	2.77	2.3e-24			↑
<i>Cd84</i>	CD84 antigen	1.96	2.0e-06			
<i>Clec7a</i>	C-type lectin domain family 7, member a	3.06	1.62e-13			
<i>Csf1r</i>	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	1.57	1.4e-10	↑		
<i>Csf3r</i>	Granulocyte colony-stimulating factor receptor	2.05	4.3e-12			
<i>Ctsd</i>	Cathepsin D	1.58	1.2e-11			
<i>Ctss</i>	Cathepsin S	1.92	2.2e-08			
<i>Ctsz</i>	Cathepsin Z	1.55	1.1e-08			
<i>Cx3cr1</i>	CX3C chemokine receptor 1	1.53	5.7e-06	↕		
<i>Cxcl9</i>	C-X-C motif chemokine 9	0.61	1.0e-02	↕		
<i>Cyba</i>	Cytochrome b-245 light chain	1.65	7.3e-03			
<i>Dcstamp</i>	Dendritic cell-specific transmembrane protein	1.60	3.3e-02			
<i>Endou</i>	Poly(U)-specific endoribonuclease	2.07	1.3e-12			
<i>Enpp3</i>	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3	0.62	1.6e-03			
<i>Fbxo40</i>	F-box protein 40	0.60	4.2e-05			
<i>Fcer1g</i>	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	1.93	1.6e-07	↑		
<i>Fcgr1</i>	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I	1.51	3.6e-04	↑		
<i>Fcgr3</i>	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region	1.87	2.7e-07	↑		



	receptor III					
<i>Fgr</i>	Tyrosine-protein kinase Fgr	1.59	1.9e-02			
<i>Fyb</i>	FYN-binding protein	1.51	1.2e-03			
<i>Gpr183</i>	G protein coupled receptor 183	1.56	1.3e-03			
<i>Gpr84</i>	G protein-coupled receptor 84	1.66	1.2e-02			
<i>H2-Oa</i>	Histocompatibility 2, O region alpha locus	1.59	3.4e-02			
<i>H2-Ob</i>	Histocompatibility 2, O region beta locus	1.85	1.2e-06			
<i>Havcr2</i>	Hepatitis A virus cellular receptor 2 homolog	1.91	2.8e-07	↑		
<i>Hcar2</i>	Hydroxycarboxylic acid receptor 2	1.86	9.6e-04			
<i>Hexb</i>	Hexosaminidase B	1.52	2.4e-06			
<i>Hvcn1</i>	Hydrogen voltage-gated channel 1	1.86	5.2e-06			
<i>Il1a</i>	Interleukin-1 alpha	1.61	2.6e-02	↑		
<i>Il1rn</i>	Interleukin-1 receptor antagonist protein	1.71	6.3e-03	↑		
<i>Irf5</i>	Interferon regulatory factor 5	1.57	3.9e-05			
<i>Irf8</i>	Interferon regulatory factor 8	1.81	1.5e-06			
<i>Itgax</i>	Integrin alpha-X	5.02	2.2e-24			↑
<i>Itgb2</i>	Integrin beta-2	1.63	3.3e-04	↑		↑
<i>Lag3</i>	Lymphocyte-activation gene 3	2.16	8.4e-09			
<i>Lat2</i>	Linker for activation of T-cells family member 2	1.58	2.2e-05			
<i>Lgals3</i>	Galectin-3	3.39	3.8e-23			
<i>Lrrc17</i>	Leucine-rich repeat-containing protein 17	1.64	2.1e-02			
<i>Ly86</i>	Lymphocyte antigen 86	1.53	3.1e-02	↑		
<i>Ly9</i>	T-lymphocyte surface antigen Ly-9	1.68	1.2e-03			
<i>Lyz2</i>	Lysozyme 2	1.52	1.1e-02			↑
<i>Mpeg1</i>	Macrophage expressed gene 1	2.57	4.17e-13			↑
<i>Myo1f</i>	Unconventional myosin-If	1.82	1.4e-06			
<i>Naip2</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 1b	1.67	2.0e-04	↑		
<i>Naip5</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 1e	1.98	1.1e-09	↑		
<i>Naip6</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 1f	1.70	2.8e-03	↑		
<i>Nckap1l</i>	Nck-associated protein 1-like	1.54	3.8e-06			
<i>Nme2</i>	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2	1.50	1.6e-02			
<i>Pdcd1</i>	Programmed cell death protein 1	4.37	2.5e-21			
<i>Pitx2</i>	Pituitary homeobox 2	1.54	4.3e-02			
<i>Pla2g3</i>	Phospholipase A2, group III	0.58	9.4e-05			
<i>Plau</i>	Plasminogen activator, urokinase	1.76	1.3e-06			↑
<i>Pld4</i>	Phospholipase D4	1.73	1.7e-08			
<i>Ptafr</i>	Platelet-activating factor receptor	1.75	5.1e-08	↑		
<i>Ptprq</i>	Phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ	0.55	1.1e-03			
<i>Ptx3</i>	Pentraxin-related protein PTX3	2.47	4.2e-13			
<i>Serpinf2</i>	Serpin f2	2.57	5.7e-08	↑		↑
<i>Siglecf</i>	Sialic acid binding Ig-like lectin F	1.62	2.2e-02			
<i>Six4</i>	Homeobox protein SIX4	0.63	4.5e-04			
<i>Slamf8</i>	SLAM family member 8	1.78	2.8e-03			
<i>Slamf8</i>	SLAM family member 8	1.78	2.8e-03	↑		
<i>Slc11a1</i>	Natural resistance-associated macrophage protein 1	2.16	3.6e-19	↑		
<i>Thy1</i>	Thy-1 membrane glycoprotein	2.39	2.5e-27			
<i>Ticam2</i>	TIR domain-containing adapter molecule 2	1.54	3.2e-02	↑		
<i>Timpl</i>	Metalloproteinase inhibitor 1	2.32	1.2e-07	↑		
<i>Tlr2</i>	Toll-like receptor 2	2.02	2.0e-12	↑		
<i>Tnfaip8l2</i>	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8-like protein 2	1.70	4.2e-05			

<i>Tnfrsf1a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	1.51	1.7e-06	↑	
<i>Tnfsf8</i>	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 8	1.74	3.9e-03		
<i>Trem2</i>	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	3.08	2.6e-27		
<i>Tyrobp</i>	TYRO protein tyrosine kinase-binding protein	2.42	3.6e-13		
<i>Unc93b1</i>	Protein unc-93 homolog B1	1.53	3.2e-03		
<i>Zbtb16</i>	Zinc finger and BTB domain containing 16	0.59	9.7e-03		

**Table 2: Deregulated genes in immune system of spinal cord CHMP2B<sup>intron5</sup> mice when compared to littermate non transgenic mice at asymptomatic stage. ↑: up-regulated gene; ↓: down-regulated gene.**

Gene name	Description	Fold change	Adjusted p-value	Plasma lipoprotein assembly, remodeling, and	Cholesterol metabolism	Synthesis of very long-chain fatty acyl-CoAs	Steroids metabolism
<i>A2m</i>	Alpha-2-macroglobulin	1.55	5.16e-05	↑			
<i>Abcc3</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	1.79	4.48e-08				↑
<i>Akr1c4</i>	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase type 1	0.64	1.53e-02				↓
<i>Apoc1</i>	Apolipoprotein C-I	2.34	4.58e-10	↑	↑		
<i>ApoE</i>	Apolipoprotein E	1.75	1.99e-04	↑	↑		
<i>Aspg</i>	60 kDa lysophospholipase	2.19	1.67e-08				
<i>Cubn</i>	Cubilin	0.65	1.97e-03	↓			↓
<i>Elovl2</i>	Elongation of very long chain fatty acids protein 2	0.66	4.19e-07			↓	
<i>Gpd1</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic	0.65	1.58e-07				
<i>Hexb</i>	Beta-hexosaminidase subunit beta	1.52	2.41e-06				
<i>Hmgcs1</i>	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	0.66	7.36e-06		↓		↓
<i>Hpgds</i>	Hematopoietic prostaglandin D synthase	1.69	9.44e-08				
<i>Hsd11b1</i>	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	0.55	2.87e-10				↓
<i>Hsd17b3</i>	Testosterone 17-beta-dehydrogenase 3	1.75	3.22e-03			↑	↑
<i>Idi1</i>	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	0.66	2.25e-04		↓		↓
<i>Ip6k3</i>	Inositol hexakisphosphate kinase 3	1.61	1.21e-04				
<i>Lipg</i>	Endothelial lipase	0.64	4.50e-02	↓	↓		
<i>Lpl</i>	Lipoprotein lipase	1.90	1.99e-04	↑	↑		
<i>Pla2g3</i>	Phospholipase A2, group III	0.58	9.40e-05				
<i>Plb1</i>	Phospholipase B1, membrane-associated	1.53	3.79e-02				
<i>Pld4</i>	Phospholipase D4	1.73	1.67e-08				
<i>Sgpp2</i>	Sphingosine-1-phosphate phosphatase 2	0.65	8.10e-08				
<i>Sptssb</i>	Serine palmitoyltransferase small subunit B	0.62	5.60e-08				
<i>Tecrl</i>	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like	0.63	2.13e-02			↓	
<i>Tnfaip8l2</i>	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 2	1.70	4.24e-05				
<i>Tnfrsf1a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	1.51	1.75e-06				
<i>Ugt8a</i>	2-hydroxyacyl sphingosine 1-beta-galactosyltransferase	0.65	3.11e-03				

**Table 3: Deregulated genes involved in lipids metabolism of spinal cord CHMP2B<sup>intron5</sup> mice when compared to littermate non transgenic mice at asymptomatic stage. ↑: up-regulated gene; ↓: down-regulated gene.**

Gene name	Description	Fold Change	Adjusted p-value	K <sup>+</sup> channels	Voltage-gated K <sup>+</sup> channels	Cholinergic receptors	Neurotransmitter transporters & transmission across chemical synapse	Phase 0 rapid depolarization	Axon guidance
<i>Abcc9</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	0.65	1.20e-03	↓					
<i>Cacnb3</i>	Calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	1.62	2.70e-04				↑	↑	↑
<i>Chrna2</i>	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2 (neuronal)	0.32	4.30e-21			↓	↓		
<i>Chrna6</i>	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 6	2.03	3.11e-05			↑	↑		
<i>Chrn3</i>	Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 3	1.68	1.41e-03			↑	↑		
<i>Col6a1</i>	Collagen, type VI, alpha 1	1.54	2.20e-04						↑
<i>Cxcl12</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	0.65	1.62e-03						↓
<i>Dcc</i>	Deleted in colorectal carcinoma	0.57	7.94e-04						↓
<i>Dok4</i>	Docking protein 4	2.13	7.65e-06						↑
<i>Dok6</i>	Docking protein 6	0.67	2.92e-02						↓
<i>Epha6</i>	Eph receptor A6	0.66	1.78e-02						↓
<i>Gabrb2</i>	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 2	0.61	7.74e-03				↓		
<i>Gabbr2</i>	Gamma-aminobutyric acid (GABA) C receptor, subunit rho 2	1.77	2.35e-03				↑		
<i>Gfra3</i>	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 3	2.84	2.80e-10						↑
<i>Glr1</i>	Glycine receptor, alpha 1 subunit	0.56	8.24e-04				↓		
<i>Gnb3</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 3	1.67	2.69e-03	↑			↑		
<i>Hcn2</i>	Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K <sup>+</sup> 2	0.64	1.72e-04	↓					
<i>Hcn3</i>	Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K <sup>+</sup> 3	1.58	2.89e-03	↑					
<i>Htr3b</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3B	1.72	3.77e-03				↑		
<i>Isl2</i>	Insulin related protein 2 (islet 2)	2.17	1.29e-05						↔
<i>Itga1</i>	Integrin alpha 1	0.64	6.44e-03						↓
<i>Itga2</i>	Integrin alpha 2	0.66	3.94e-02						↓
<i>Itgb3</i>	Integrin beta 3	0.67	3.10e-04						↓
<i>Kcna1</i>	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1	0.61	1.47e-09	↓	↓				
<i>Kcna2</i>	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member	0.64	5.62e-11	↓	↓				

	2								
<i>Kcnc3</i>	Potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	0.54	4.08e-14	↓	↓				
<i>Kcng4</i>	Potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 4	0.65	1.96e-05	↓	↓				
<i>Kcnh4</i>	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 4	1.64	2.04e-03	↑	↑				
<i>Kcnj4</i>	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4	1.52	3.62e-02	↑			↑		
<i>Kcnmb1</i>	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1	1.58	6.65e-03	↑					
<i>Kcns1</i>	K <sup>+</sup> voltage-gated channel, subfamily S, 1	1.63	3.90e-04	↑	↑				
<i>Kcnv1</i>	Potassium channel, subfamily V, member 1	1.53	1.92e-02	↑	↑				
<i>Plcb3</i>	Phospholipase C, beta 3	1.81	8.03e-05				↑		
<i>Robo1</i>	Roundabout homolog 1	0.64	4.94e-06				↓		↓
<i>Scn10a</i>	Scn10a : sodium channel, voltage-gated, type X, alpha	2.15	3.89e-15					↑	↑
<i>Scn11a</i>	Scn11a : sodium channel, voltage-gated, type XI, alpha	3.51	7.51e-26					↑	↑
<i>Scn4b</i>	Scn4b : sodium channel, type IV, beta	0.55	2.59e-17					↓	↓
<i>Scn9a</i>	Scn9a : sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	2.03	2.58e-05					↑	↑
<i>Slc17a7</i>	Solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7	3.42	3.80e-23				↑		
<i>Slc6a12</i>	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), member 12	1.52	1.60e-02				↑		
<i>Slc6a4</i>	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	0.64	2.03e-02				↓		
<i>Slc6a5</i>	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 5	0.61	5.54e-08				↓		
<i>Unc5b</i>	Unc-5 homolog B	0.66	3.38e-04						↓

**Table 4: Deregulated genes involved in the neuronal system of spinal cord CHMP2B<sup>intron5</sup> mice when compared to littermate non transgenic mice at asymptomatic stage. ↑: up-regulated gene; ↓: down-regulated gene.**

Gene name	Description	Fold Change	Adjusted <i>p</i> -value	K <sup>+</sup> channels	Voltage-gated K <sup>+</sup> channels	Cholinergic receptors	Transmission across chemical synapse
<i>Chrna2</i>	Cholinergic receptor nicotinic alpha 2 subunit	0.27	1.70e-33			↘	↘
<i>Chrnb4</i>	Cholinergic receptor nicotinic beta 4 subunit	1.57	9.04e-05			↗	↗
<i>Gabrr2</i>	Gamma-aminobutyric acid type A receptor rho2 subunit	2.63	1.59e-09				↗↗
<i>Glrb</i>	Glycine receptor beta	0.65	3.26e-05				↘↘
<i>Hcn2</i>	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium and sodium channel 2	0.68	1.24e-04	↘			
<i>Hcn3</i>	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 3	1.54	1.13e-03	↗			
<i>Kcna1</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 1	0.61	4.17e-12	↘	↘		
<i>Kcna2</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 2	0.65	7.61e-13	↘	↘		
<i>Kcnc3</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily C member 3	0.60	1.85e-12	↘	↘		
<i>Kcnh4</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 4	1.53	2.69e-03	↗	↗		
<i>Kcnh7</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 7	0.66	1.92e-03	↘	↘		
<i>Kcnk7</i>	Potassium two pore domain channel subfamily K member 7	1.65	5.95e-03	↗			
<i>Kcns3</i>	Potassium voltage-gated channel modifier subfamily S member 3	0.66	1.36e-09	↘	↘		
<i>Prkcg</i>	Protein kinase C gamma	1.53	2.54e-08		↗		↗
<i>Slc18a3</i>	Solute carrier family 18 member A3, vesicular transporter of acetylcholine	1.53	3.14e-03				↗

**Table 5: Deregulated genes involved in the neuronal system of spinal cord CHMP2B<sup>intron5</sup> mice when compared to littermate non transgenic mice at end stage. ↗: up-regulated gene; ↘: down regulated gene.**

Gene name	Description	Fold Change	Adjusted <i>p</i> -value	Collagen biosynthesis and modifying enzymes	Integrin cell surface interactions	Proteoglycan
<i>Acan</i>	Aggrecan	0.57	3.67e-16			↓
<i>Adamts14</i>	A disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 14	1.57	3e-04	↑		
<i>Bmp1</i>	Bone morphogenetic protein 1	1.58	2e-05	↑		
<i>Col20a1</i>	Collagen, type XX, alpha 1	1.51	1e-03	↑		
<i>Col27a1</i>	Collagen, type XXVII, alpha 1	1.64	3e-05	↑		
<i>Col6a1</i>	Collagen, type VI, alpha 1	1.54	2e-04	↑		
<i>Col9a3</i>	Collagen, type IX, alpha 3	1.52	3e-03	↑	↑	
<i>Hapln1</i>	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	0.46	9.82e-13			↓
<i>Itga1</i>	Integrin alpha 1	0.60	4e-04		↓	
<i>Itgad</i>	Integrin, alpha D	1.98	9e-05		↑	
<i>Itgax</i>	Integrin alpha X	1.94	2e-04		↑	
<i>Itgb3</i>	Integrin beta 3	0.63	1e-06		↓	
<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	0.58	7e-07		↓	

**Table 6: Deregulated genes involved in the extracellular matrix of spinal cord CHMP2B<sup>intron5</sup> mice when compared to littermate non transgenic mice at end stage. ↑: up-regulated gene; ↓: down-regulated gene.**

	Up	Down
Neuronal system	<i>Gpr179, Hspb1, Nnat, Pdlim4, Sspo, Uts2,</i>	<i>Chrna2, Kcn3, Kcnh4, Scn4b, Slc6a5, Steap2, Strip2</i>
Immune system	<i>C4a, C4b, Lgals3, Thy1</i>	
Lipid metabolism	<i>Apoc1</i>	<i>Gpd1, Hsd11b1, Sptssb, Ugt8a</i>
ECM		<i>Acan, Hapln1</i>
Transcription	<i>Atf3, Batf3, Prrx2, Wisp2</i>	<i>Smyd1</i>
Other	<i>Agt, Calcb, Cartpt</i>	<i>Apln, Aqp6, Atp2b1, Fbxo40, Mybpc3, Olfir287</i>
Unknown		<i>Gm4521700008O03Rik, 4930432E11Rik, 5031414D18Rik, A730020M07Rik, Gm10684, Gm15512, Gm21984, Gm26633, Gm26673, Gm33366, Gm4524</i>

**Table 7: Genes deregulated at the three stages studied in spinal cord of CHMP2B<sup>intron5</sup> mice when compared to littermate non transgenic mice.**



Process	Genes		Adverse regulation
	Up	Down	
<b>Immune system Inflammatory response</b>	<i>Calca, Calcb, Cd44, Clic, Endou, Gent2, Hcar2, Lgals3, Ly86, Slc7a7, Ucn, Tagln2</i>		<i>Spp1, Fcrls</i>
<b>Transcription</b>	<i>Atf3, Bcl3, Crym, Runx1, Wisp2</i>		<i>Slfn5</i>
<b>Lipids and lipoproteins clearance</b>	<i>Anxa2</i>	<i>Ugt8a</i>	
<b>Neuronal system</b>	<i>Gpr35, Hspb1</i>		
<b>Translation repressor</b>	<i>Eif4ebp1</i>		
<b>Cell-cell interaction</b>	<i>Ppl</i>		
<b>Unknown function</b>		<i>RIKEN cDNA 4930432E11 gene, RIKEN cDNA A730020M07 gene</i>	

**Table 8: Common deregulated genes in spinal cord of CHMP2B<sup>intron5</sup> and SOD1<sup>G86R</sup> mice at symptomatic stages.**

<b>Genes</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<i>Acan</i>	CGTTGCAGACCAGGAGCAAT	CGGTCATGAAAGTGGCGGTA
<i>Acta</i>	TTGTGTGTGACAACGGCTCT	CCACGATGGATGGGAACACA
<i>Apln</i>	AAGATTGGCCCAGCCTACAC	TTTCTGGGGGAACGATCAGC
<i>Asah2</i>	ACCCCGTGAGCATGAACAAT	TGCTACAAACGGTCCCTGTC
<i>Clqa</i>	AGGACTGAAGGGCGTGAAAG	CAAGCGTCATTGGGTTCTGC
<i>Clqc</i>	GTGGAGGGCCGATACAAACA	CTCTGGGTAAGGGTGGTCT
<i>C4b</i>	TCTGAAGCCTCCAACGTTCC	GGCCAATTCCATTGGTGCTC
<i>Calca</i>	GCTCACCAGGAAGGCATCAT	CATGCCTGGTACAGGAGCAA
<i>Ecell</i>	ACCATCATTGGGCACGAACT	TCCACCAGTGCAACAGGTTT
<i>Fln</i>	TCCGCCAAATGAAGCTGGAA	CACGAGCTTGATGTGTTCCC
<i>Gfap</i>	AGAAAACCGCATCACCATTC	TCACATCACCACGTCTTGT
<i>Gnptab</i>	AAGATTGGCCCAGCCTACAC	TTTCTGGGGGAACGATCAGC
<i>Hsd11b1</i>	CCAAGCTTCTCCAAGGAGG	AGTACACCTCGCTTTTGCCT
<i>Kcnc3</i>	CCTGCCCATGGCTCAAGAA	TGCTGCAGGGTCTCCATTG
<i>Mpeg1</i>	AACCTGACAAGCTACCTGGC	GTGCATCCTGGGTGAGTGTT
<i>Nnat</i>	CTGGGTAGGATTCGCTTTTTCG	GGGAGTACCTGAACACCTCAC
<i>Nptx2</i>	CTTAGCCGCTCCTTGCAAAC	AGCCCAGCGTTAGACACATT
<i>Plcb3</i>	CTGCCTGTCTCTGCTATCCG	CAGGCACAAAGGTTGGTTGG
<i>Pol2</i>	GCTGGGAGACATAGCACCA	TACTCCCCTGCATGGTCTC
<i>Sc5d</i>	CAGACTGGTCTACAAGCGCA	AAGCATGACTTGCAAACGGC
<i>Scn4b</i>	GACGGGATCGTGAAGAACGA	TGGAGCCCTCTAGGGTGATT
<i>Slc2a4</i>	GGGGTTATCAATGCCCCACA	TTGTGGGATGGAATCCGGTC
<i>Spp1</i>	GTGGTGCCAAGAGTGTGTTTG	CAATGCCAAACAGGCAAAAGC
<i>Sptssb</i>	GACCATTGTGGCTATGGTGGTA	AAATTCCAAGCCAGGCGG
<i>Tagln2</i>	GATCCAGGCCTCTTCGATGG	CTGGAAGATGTCCGTGGTGT
<i>Tbp</i>	CAGCCAAGATTCACGGTAGAT	CCAATGACTCCTATGACCCCTA
<i>Tyrobp</i>	ATGCGACTGTTCTTCCGTGA	AGTACACAGCCAGGGCAATC
<i>Unc13c</i>	TAAAGCAGATGGGTGCCGAG	CGCCGCACTGTTCTTATTCG

**Supplementary table 1:** Primer sequences used for qPCR.

## II. Publication 2 : Le mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* entraîne une altération fonctionnelle du lysosome et une répression de l'autophagie (en préparation)

L'autophagie est un processus récurrent dans les maladies neurodégénératives de par la formation d'inclusions protéiques dans différentes sous-populations neuronales. De plus, parmi les gènes mutés dans la SLA et la DFT, il en est une majorité qui sont liés à l'homéostasie protéique. L'étude transcriptomique menée en parallèle (sur un modèle murin exprimant *CHMP2B<sup>intron5</sup>*) a mis en évidence avant l'apparition des symptômes, la dérégulation de 21 gènes associés d'un point de vue fonctionnel au lysosome chez les souris exprimant *CHMP2B<sup>intron5</sup>*. Parmi ces gènes on trouve des protéases de type cathepsine, des récepteurs de surface ou des enzymes de conversion de glucides complexes ou de lipides complexes. Nous avons montré par la suite que les neurones moteurs et les motoneurones exprimant le mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* développaient progressivement une accumulation de corps multivésiculaires et de structures denses aux électrons de grande taille (>10 $\mu$ m<sup>2</sup>). Par des approches immunohistologiques, nous avons identifié ces structures comme étant des lysosomes et plus particulièrement des lysosomes secondaires ou autolysosomes. Ces autolysosomes semblent s'accumuler de manière précoce dans les neurones moteurs et les motoneurones exprimant le mutant « intron 5 ».

Nous avons ensuite étudié le processus autophagique dans son ensemble par deux approches. Des quantifications de l'expression génique par qPCR ont révélé une répression tardive de gènes en lien avec l'initiation de l'autophagie présumant d'une répression de ce processus. Après un co-marquage des autophagosomes et autolysosomes par transduction virale, nous avons ensuite quantifié le flux autophagique afin de déterminer l'efficacité relative du processus autophagique chez les souris transgéniques. Ces analyses n'ont pas révélé de perturbation du flux autophagique en réponse à l'expression du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>*. En revanche, le nombre de chacune des structures en lien avec le processus autophagique (autophagosomes, autolysosomes, lysosomes) est plus faible chez les souris transgéniques que chez les souris non transgéniques, appuyant l'hypothèse d'une répression de l'autophagie en réponse au mutant « intron 5 ». Enfin, nous avons comparé une partie de ces données avec celles d'un autre modèle de SLA : le modèle *SOD1<sup>G86R</sup>*. Les dérégulations des gènes impliqués dans la fonction lysosomale sont en partie retrouvées dans ce second modèle mais uniquement au stade terminal de la maladie. De plus, à ce stade, les neurones moteurs et les motoneurones ne présentent pas d'accumulation de lysosomes.

Ces données nous ont permis de montrer dans le modèle *CHMP2B<sup>intron5</sup>* une altération très précoce de l'étape finale du processus autophagique associée à une répression de l'initiation de l'autophagie. De plus, bien que l'homéostasie protéique soit également perturbée dans un modèle de SLA lié à la mutation *SOD1*, les neurones vulnérables dans ce modèle ne présentent pas d'altération au niveau de l'étape finale de l'autophagie.

**CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant induces functional alterations of lysosomal and represses autophagy.**

Waegaert Robin<sup>1</sup>, Dirrig-Grosch Sylvie<sup>1</sup>, Parisot Florian<sup>1</sup>, Fischer Mathieu<sup>1</sup>, Loeffler Jean-Philippe<sup>1</sup>, René Frédérique<sup>1,\*</sup>.

1 : Université de Strasbourg, INSERM U1118 Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence, Strasbourg, France.

\* : Corresponding author

Mail : frederique.rene@unistra.fr

## **Abstract**

Autophagy is a central process in neurodegenerative diseases especially in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and FrontoTemporal Dementia (FTD) in which patients present with an accumulation of large intraneuronal inclusions. Several genes associated with ALS and/or FTD are involved in protein homeostasis or autophagy. Among them *CHMP2B* was the first gene discovered involved in the ALS-FTD continuum. It encodes a protein belonging to the ESCRT-III complex implicated in the endolysosomal/autophagy pathway. To better understand the consequences of *CHMP2B* mutant expression on the autophagy process *in vivo*, we used a mouse model expressing *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mutant in neurons and developing a progressive phenotype reminiscent to both ALS and FTD. Our study highlighted an early and progressive accumulation of autolysosomes in the cytoplasm of neurons expressing the *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mutant associated with a deregulation of lysosome-related genes. In addition, the expression of *CHMP2B<sup>intron5</sup>* led to a repression of autophagy process and a decrease of the autophagy vesicles formation in vulnerable motor neurons without change in autophagic flux. By comparison with the *SOD1<sup>G86R</sup>* ALS mouse model, we showed that autophagy was altered at a later stage in the course of the disease in *SOD1<sup>G86R</sup>* ALS mice compared to *CHMP2B<sup>intron5</sup>*. In addition we found that *Gnptab* was selectively repressed in the *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mouse model, therefore pointing out *Gnptab* as a potential important actor in the lysosomal storage disorder observed in *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mice.

## **Introduction**

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by a loss of upper and lower motoneurons. Still incurable, ALS leads to progressive paralysis of voluntary muscles and to death of patients between two to five years after diagnosis. FrontoTemporal Dementia (FTD) is the second most common form of pre-senile dementia before 65 years of age. FTD is characterized by an atrophy of several brain structures, frontal and temporal lobes of the cortex and hippocampus being the most altered [1-3]. Patients suffer of emotional and cognitive troubles as a loss of empathy, apathy or aggressiveness [4].

Seemingly very different, these two diseases share a clinical continuum highlighted by the overlapping of clinical symptoms presented by patients. About 15% of ALS patients present FTD-related symptoms and reciprocally [5]. Moreover, genetic and histopathological links exist between ALS and FTD. Indeed, more than half of the mutated genes initially described in ALS patients were thereafter found mutated in FTD or ALS-FTD patients such as *C9ORF72* [6], *FUS* [7, 8], *TARDBP* [9, 10] or *P62* [11]. Studies of post mortem tissues obtained from ALS or FTD cases also highlighted common histological hallmarks such as accumulation of neuronal inclusions [12] or activation of glial cells [13-15].

Linked to about 1% of ALS and FTD cases, *CHMP2B* (Charged Multivesicular Body Protein 2B) was the first gene associated with ALS-FTD syndrome [16, 17]. The most common mutation in *CHMP2B*, named *CHMP2B<sup>intron5</sup>* is a point mutation that causes retention of a part of fifth intron and the translation of two aberrant proteins deleted of their C-terminus part [18]. The endogenous protein CHMP2B encodes a partner belonging to ESCRT-III complex (endosomal sorting complexes required for transport). This complex is involved in the biogenesis of vesicles by scission of preexisting membrane. In neurons, studies have demonstrated the role of ESCRT-III in vesicles trafficking, cytokinesis, dendritic spines formation and autophagy [19].

Autophagy and endocytosis are two highly conserved and tightly linked processes in eukaryotes cells. They allow the degradation and the turnover of elementary constituents of cells. Autophagy is also an essential homeostatic process involved in the degradation of diverse cellular components including organelles and protein aggregates.

Autophagy requires the formation of a double-membrane structure named autophagosome which engulf cytoplasmic material like proteins, nucleic acids or organites. Autophagy promotes their degradation by fusion with a lysosome containing acid hydrolases. Autophagic process plays a preponderant role in ALS and FTD diseases since the majority of known mutated genes are involved in protein homeostasis or directly in autophagy [20].

Shortly after the discovery of the implication of CHMP2B in ALS and FTD, Van der zee and collaborators [21] showed that endosomes were accumulated in *CHMP2B<sup>intron5</sup>* expressing cells. This result was confirmed in fibroblast from FTD patients in which fusion between endosomes and lysosomes was delayed, without alteration in the formation of multivesicular bodies [22]. In addition, *CHMP2B<sup>intron5</sup>* induced an accumulation of autophagosomes *in vitro* suggesting that depletion of ESCRT subunits impaired the fusion between autophagosome and lysosome [23-25]. However, most of these studies were performed in cellular models and did not take into account neither the physiological/cellular environment of the motor neurons nor their relationship with the surrounding cells.

To circumvent this problem, we have evaluated the effect of *CHMP2B<sup>intron5</sup>* mutant on the autophagic process in motor neurons of a transgenic mouse model expressing *CHMP2B<sup>intron5</sup>* in neurons. This model recapitulates characteristic hallmarks of ALS and FTD (i.e. accumulation of neuronal protein inclusions, progressive motor impairments and behavior alterations) [26]. In this study, we show a double perturbation of autophagy in the *CHMP2<sup>intron5</sup>* mice. Indeed, upper and lower motor neurons present with an early and progressive accumulation of autolysosomes containing insoluble aggregates associated with a deregulation of lysosome-related genes. We also highlighted a repression of autophagy initiation with a decreased expression of *beclin* and *Ulk1* and a decrease of autophagosome and lysosome formation. Finally, comparison of these data with those obtained in *SOD1<sup>G86R</sup>* ALS

mouse model showed a specific accumulation of autolysosomes in the *CHMP2B*<sup>intron5</sup> model and let suppose an implication of *Gnptab* in these alterations. Altogether, our data show autophagy as a top-notch and precocious process in the neurodegeneration of upper and lower motoneurons.

Key words: *CHMP2B*<sup>intron5</sup>, Lysosome, autophagy, autophagosomes, autophagic flux, FrontoTemporal Dementia, Amyotrophic Lateral Sclerosis, *SOD1*<sup>G86R</sup>.

## **Material and Methods:**

### **Ethics statement**

All animal experimentations were performed in accordance with institutional and national guidelines, and approved by the local ethical committee from Strasbourg University (CREMEAS) and the ministry of higher education and research under numbers AL/51/58/02/13 APAFIS#9494-2017040316393769 in accordance with European regulations (Directive 2010/63/EU).

### **Animals**

Transgenic mice overexpressing the human *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mutant under the Thy1.2 promoter were genotyped as previously described [26]. For biochemical analysis, male *CHMP2B*<sup>intron5</sup> transgenic mice were compared with their control non-transgenic (nTg) littermates. For histological analysis, female *CHMP2B*<sup>intron5</sup> transgenic mice were compared with their control non-transgenic (nTg) littermates.

Mice were group-housed (2–5 per cage) in the animal facility of the medicine faculty of Strasbourg University, in a temperature- and humidity-controlled environment at 22±1 °C under a 12-h light/dark cycle with unrestricted access to regular A04 rodent chow and water.

Heterozygous (HE; six copies of transgene) mice were studied at four pre-defined stages of disease progression: at 6 months of age, an asymptomatic stage when motor symptoms are absent; at 12 months of age corresponding to the onset of the disease when alteration of hindlimb extension is detected; 18 months of age corresponding to the symptomatic stage of the disease when mice develop signs of hindlimb weakness and decrease of grip strength; and 24 months of age corresponding to the end (E) stage of the disease when mice display hindlimb paralysis or loss of the righting reflex. For homozygous (HO, twelve copies of transgene) mice, asymptomatic stage corresponds to 1.5 months of age and symptomatic stage corresponds to 6 months of age.

### **Design and construction of AAV2.2 vectors**

The mCherry-LC3 plasmid was kindly provided by Dr Hetz C. (Santiago, Chile). The whole mCherry-LC3 expression cassette was excised from the plasmid and inserted into a shuttle pro-viral plasmid,

containing both the AAV2/2 inverted terminal repeats (ITRs) and the 1.6-kb cytomegalovirus enhancer promoter [27].

### **Intraspinal injections of mCherry-LC3 AAV2.2**

6 months-old mice were anesthetized by intraperitoneal (IP) injection of a mixture of ketamine (80mg/kg body mass)-xylazine (10mg/kg body mass). After disinfection, skin was incised at the level of the thoracic/lumbar segment of the spinal column, the spinal cord was exposed after sectioning the paraspinal muscles. The tissue between the processi spinosi of L1 and L2 vertebrae was removed. Glass microcapillaries connected to a nanoinjector system (3-000-205A, Drummond) were used to inject a total of 1  $\mu$ l of viral solution bilaterally (5 sites/hemicord) at the L1 level (total of  $2 \times 10^{10}$  AAV particles). To prevent any leaking of viral solution, the glass microcapillaries were allowed to remain in place for at least 1 minute after each injection, and were retracted slowly from the spinal cord. Muscles and skin were sutured and metacam (5mg/kg body weight) was injected subcutaneously. Animals were allowed to wake up and recover from the operation under a heating lamp for 1 hour. Metacam was injected once a day for three additional days to limit pain following surgery. Fifteen days after the surgery, mice were deeply anesthetized with a solution of ketamine (100mg/kg body weight)-xylazine (10mg/kg body weight) injected intraperitoneally and perfused with 4% ice-cold paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4.

### **Measure of autophagic flux**

Autophagy flux was assessed on vibratome lumbar spinal cord sections (40  $\mu$ m thick) of 6 months of age nTg and HE mice 15 days after transduction with the LC3-mCherry AAV2.2. Lysosomes and autolysosomes were immunostained with an antibody directed against cathepsin D as described below. For the quantitative analysis, 1 image was taken with a 63X oil- objective in the middle of the nucleus corresponding to the center of the motor neuron. Twenty motor neurons were analyzed per animal, with 4 nTg and 5 HE mice. Background signal was excluded determining a threshold over which fluorescent intensity was considered as positive in relation to negative controls using the ImageJ software.

A plugin on ImageJ software was used allowing the calibration of pixel size, the selection of positive cells in ROI manager and the counting of specific binary particles for each transduced neuron.

The autophagy flux was assessed by two complementary methods: as described by Castillo et al [27] as follow:

$$\text{autophagy flux} = \frac{\text{number of LC3 positive vesicles}}{\text{number of autophagosomes}}$$

And by using the formula used by Elrick et al [28]:



$$\text{autophagy flux} = \frac{\text{number of autolysosomes}}{\text{number of LC positive vesicles}}.$$

## **Electron Microscopy**

Mice were deeply anesthetized with a solution of ketamine (100mg/kg body mass)-xylazine (10mg/kg body mass) injected intraperitoneally, and perfused with paraformaldehyde 2.5%, glutaraldehyde 2.5%, calcium chloride 50mM in cacodylate sodium 0.1M, pH 7.4. Frontal cortex and lumbar spinal cord were then micro-dissected and post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 m cacodylate buffer for 1 h at 4°C. Following steps were performed at the imagery center of IGBMC (Illkirch, France). Briefly, samples were dehydrated through graded ethanol (50, 70, 90 and 100%) and propylene oxide for 30 min each and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were cut at 70 nm, contrast strained with uranyl acetate and lead citrate and examined at 70 kv using a Morgagni 268D electron microscope. Images were captured digitally using a Mega View III camera (Soft Imaging System).

## **Histology**

Mice were deeply anesthetized with a solution of sodium pentobarbital (120mg/kg body mass) and perfused transcardially with 4% ice-cold paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1M pH 7.4. Tissues were post-fixed in the same fixative solution for 24 hours and kept at 4 °C in PBS until use.

Forty micrometers-thick sections of brain and spinal cord were performed using a Leica VT1000S vibratome. Free-floating sections were pre-treated 30 minutes in citrate buffer 0.1M pH6.0 at 80°C and incubated 1 hour in blocking solution containing 0.3% triton-X100, 8% donkey serum and 0.3% BSA in PBS. Sections were incubated overnight at 4°C with selected primary antibodies diluted at the indicated concentration in the blocking solution. The following antibodies were used: anti-cathepsin D (Abcam, ab75852, 1/200), anti-choline acetyl transferase (ChAT, AB144P, Millipore, 1/50), anti-mu crystallin (Abcam, ab54669, 1/100), anti-P62 (Progen, GP-62C, 1/200), anti-ubiquitin (MAB1510, Millipore, 1/200). After three washes in PBS, sections were incubated 2 hours at room temperature with the appropriate donkey secondary antibody coupled to Alexa 488, Alexa 594 or Alexa 647 (Jackson Immunoresearch, 1/1000). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma; 1µg/ml). After 3 washes sections were mounted in Aqua/Poly-Mount (18606; Polysciences) medium on superfrost slides. Single-layer images (0.5µm optical section) were acquired using a laser-scanning microscope (confocal Leica SP5 Leica Microsystems CMS GmbH) equipped with 63× oil objective (NA1.4). Excitation wavelengths were sequentially diode 405nm, argon laser 488nm, diode 561nm, and helium neon laser 633nm. Emission bandwidths are 410-450nm for Hoechst 33342, 500-540nm for Alexa488, 570-630nm for Alexa594, and 650-710nm for Alexa 647.

To measure the size of cathepsin D-positive vesicles, a single image centered on the middle of the nucleus was performed for each motor neuron. Twenty motor neurons were analyzed per mice with 4 mice per genotype at 6, 12 and 24 months of age.

Quantification of cathepsin D-positive vesicles was performed on the ImageJ 1.48v software. Plugin was used for each image as follow: calibration of pixel size, selection of positive cells in ROI manager, analysis and counting of specific binary particles of each cell.

### **Biochemical analysis**

For biochemistry, mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (120mg/kg body mass IP) and killed by decapitation. Tissues were carefully dissected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

### **RNA extraction**

Total RNA was prepared following standard protocols. Briefly, each frozen sample was placed into a tube containing a 5-mm stainless steel bead. Working on ice, 1 mL trizol reagent (Invitrogen) was added, and homogenization was performed twice in a TissueLyser (Qiagen) at 30 Hz for 3 minutes. Samples for RNA-sequencing analysis were then processed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer instructions. For RT-qPCR, RNA was extracted with chloroform/isopropyl alcohol/ethanol technic. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

### **RNA-sequencing**

RNA-sequencing was performed on lumbar spinal cord of homozygous mice and their control littermates by the GenomEast platform (Illkirch, France). Libraries were generated from 500 ng of total RNA using TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit according to Illumina user guide (PN 15031047) with the following modifications: 2 minutes mRNA fragmentation and 12 cycles library PCR amplification. Libraries were then sequenced on an Illumina HiSeq 4000 system using single-end 1x50 bases. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads were mapped onto mm10 assembly of mouse genome using Tophat v2.0.14 [29] and bowtie2 v2.1.0 aligner [30]. Quantification of gene expression was performed using HTSeq v0.6.1 [31] using gene annotations from Ensembl release 81. Normalization and differential gene expression analysis were performed using R and DESeq2 v1.6.3 Bioconductor library [32].

### **Pathway analysis**

Gene enrichment analysis was performed by using Gene Ontology and Consensus Pathway Data Base. For these analyses, genes were selected using the following thresholds: adjusted  $p$ -value  $< 0.05$  and

$|\log_2 \text{ fold change}| > \log_2(1.5)$ . Log<sub>2</sub> fold changes were estimated using the method proposed by Love et al. [32] and implemented in DESeq2 1.6.3.

### **Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction**

One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA using Iscript reverse transcriptase (iscript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, Bio-Rad) as specified by the manufacturer. Quantitative PCR was performed on a CFX96 Real-time System (Bio-Rad) using iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad). PCR was performed as follow: 95 °C for 30 seconds, followed by 40 cycles of 4 seconds at 95 °C and 4 seconds at 60 °C. Three standard genes (Actin [Acta], Tata-box binding protein [Tbp] and RNA polymerase 2 subunit [Pol II]) were used and data were normalized with GeNorm software v3.5. Primer sequences are given in supplementary table 1.

### **Western blot analysis**

Protein extraction was performed as follow. Frozen brain tissues were dissociated in PBS without Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> (10% W/V) with protease inhibitors cocktail (P8340, Sigma). Samples were centrifuged at 1000 rpm for 10min at 4°C. Supernatants were recovered and an equal volume of PBS containing 2% laurylsarcosine and benzonase (50 units/ml) was added and gently mix 30min at 37°C before ultracentrifugation 45min, 100000g at 4°C. Supernatants containing soluble proteins were collected and pellets were washed in PBS containing 1% laurylsarcosine. Samples were centrifuged 30min, 100000g at 4°C. Pellets were resuspended in 450µl PBS containing 4% SDS. Protein quantification was performed using BCA Assay Reagent Kit (UP95424 Uptima). Equal amounts of soluble and insoluble proteins were denaturized by boiling in Laemmli Buffer (S3401, Sigma), resolved by Criterion TGX Stain Free precast gel electrophoresis gradient 4-20% (5678094, Bio-Rad) and transferred to a 0.45 µm nitrocellulose membrane using a semi-dry transblot turbo transfer system (Bio-Rad). After using 10% BSA in PBS as blocker during 1h, membranes were probed overnight with primary antibodies against cathepsin D (Abcam, ab75852, 1/1000), P62 (ab56416, 1/1000), ubiquitin (MAB1510, Millipore, 1/1000) or HA-tag (Cell signaling, 3724, 1/1000). After 3 washes with PBS containing 0.1% tritonX100, specific HRP-coupled secondary antibodies were incubated during 1h (P.A.R.I.S, anti-rabbit HRP # BI2407, anti- mouse HRP # BI2413C, 1/5000). Chemiluminescence was used to detect specific proteins bands with ECL Lumina Forte (Millipore) and a chemiluminescence detector (Chemidoc, Bio-Rad). Band intensity values were normalized by total protein load using stain free coloration.

## Statistical analysis

Unless otherwise indicated, data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. GraphPad Prism version 6.0a software was used for statistical analysis. Tests used are indicated in the legends under the figures. Differences with  $p$ -values  $<0.05$  were considered significant.

## Results

### ***CHMP2B<sup>intron5</sup> neuronal expression leads to the deregulation of lysosomal-related genes at presymptomatic stage.***

The transcriptomic analysis of lumbar spinal cord showed that lysosome-associated genes were significantly over-expressed in HO CHMP2B<sup>intron5</sup> mice compared to nTg littermates at 1.5 months of age (adjusted  $p$ -value=0.00381). Principal component analysis and heatmap generated from these data showed a genotype-related clustering (Figure 1A-B). Among the 123 genes associated with the lysosomal function according to Consensus Pathway Data Base, 21 were deregulated in HO compared to nTg mice and 8 presented with a  $|\log_2$  fold change| higher than  $\log_2(1.5)$  (Figure 1C). Three cathepsins (*CtsD*, *CtsS*, *CtsZ*) encoding cysteine proteases involved in proteolysis, two surface markers (*Cd68* and *Laptm5*), one enzyme responsible of the conversion of ganglioside 2 into ganglioside 3 (*Hexb*) and a metal ion transporter (*Slc11A1*) were up-regulated, and an enzyme involved in the targeting of acid hydrolases toward the lysosome (*Gnptab*) was down-regulated.

### ***Neurons expressing CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant display early and progressive accumulation of large autolysosomes containing aggregates.***

To determine whether the change in transcriptomic profile impact on autophagy, we studied the ultrastructure of upper and lower motor neurons by electron microscopy on eighteen months-old HE and nTg littermate mice corresponding to the symptomatic stage. At this stage, HE mice showed a decrease of weight and muscle strength compared to nTg mice (Figure S1) and motor neurons expressing CHMP2B<sup>intron5</sup> showed an accumulation of large electron-dense structures and multivesicular bodies. However, neither the size, nor the number of autophagosomes characterized by the presence of a double membrane that engulf cytosolic components seemed modified (Figure 2). The same alterations were observed in neurons from frontal cortex expressing CHMP2B<sup>intron5</sup> (Figure S2).

To determine the nature of these large electron-dense structures, we performed a double immunolabeling on lumbar spinal cord to detect cathepsin D, a protease found in lysosomes and autolysosomes, and choline acetyltransferase (ChAT), a marker of lower motor neurons (figure 3A). This study was performed at three stages of the disease: presymptomatic (6 months of age), onset (12 months of age) and end stage (24 months of age). In nTg mice, cathepsin D staining appeared as small dots distributed within the cytoplasm of ChAT positive neurons. This pattern of staining was constant

across the three ages studied. In contrast, in HE and HO mice, although still punctiform, the cathepsin D labelling was more heterogenous with an apparent increased size of the labelled structures. This increase of size was more pronounced in HO mice when compared to HE mice and seemed amplified as disease progressed. Similar observation was done in layer V cortical neurons positive for mu-crystallin (Figure S3). To ascertain our observations, we then measured and quantified these cathepsin D positive (CathD<sup>+</sup>) structures. Labelled vesicles were categorized in three groups: small vesicles (<1 $\mu\text{m}^2$ ), medium vesicles (<2 $\mu\text{m}^2$ ) or large vesicles (>2 $\mu\text{m}^2$ ). As shown in figure 3B at 6 and 12 months of age, the percentage of CathD<sup>+</sup> vesicles of medium and large size were significantly increased in transgenic mice compared to nTg mice. This effect was more pronounced at 12 months of age when compared to 6 months of age. Simultaneously the percentage of small size CathD<sup>+</sup> vesicles was decreased in transgenic mice. At 24 months of age, the increase of large CathD<sup>+</sup> structure was not significant due to an increased percentage of large size vesicles in nTg littermates. To complete this analysis, quantification of CathD<sup>+</sup> structures was also performed on cortical layer V neurons identified with mu crystallin staining and similar results were obtained (Figure S3).

To distinguish primary lysosome from autolysosomes that both are CathD<sup>+</sup>, we used P62 and ubiquitin as markers of autolysosomes and performed a triple immunostaining using antibodies directed against ubiquitin, P62 and cathepsin D. Using this approach, we showed that P62<sup>+</sup> and ubiquitin<sup>+</sup> dots colocalized with large cathD<sup>+</sup> structures. In contrast, small cathD<sup>+</sup> structures were devoided of other staining (Figure 4A). We then determined whether these large P62<sup>+</sup> and ubiquitin<sup>+</sup> structures were of soluble or insoluble nature. In soluble fraction of HE brain protein extracts, ubiquitin was decreased, P62 tended to increase and cathepsin D was not modified compared to nTg mice (Figure 4C). In contrast, in insoluble fractions, these three markers were increased in HE brain compared to nTg brain (Figure 4D). Of note, CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant protein was also found in the insoluble fraction as shown by the presence of HA-tag signal (Figure S4).

#### ***CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant represses autophagy.***

We then investigated the expression of genes directly involved at different steps of autophagy. At 6 months of age *beclin*, *Atg12*, *Ulk1* and *Hsc70* mRNA levels were significantly decreased, while *Lc3b* levels were increased and *P62* levels were unchanged in HO mice compared to age-matched nTg mice. Similar results were found in HE mice at 24 months except for *P62* whose expression level was increased compared to nTg mice (Figure 5). In cortex at 6 months of age, *Ulk1* mRNA levels were decreased in HO mice compared to control while expression of the other genes was unchanged. In HE mice, gene expression was comparable to control at 6 and 12 months but at 24 months of age *beclin*, *Atg12*, and *Lc3b* mRNA levels were significantly decreased, with a trend to decrease for *Ulk1* (p=0.075) and a trend to increase for *P62* mRNA levels (p=0.053)(Figure S4).

We then, investigated the efficacy of autophagy by measuring the autophagy flux. To this aim, AAV2.2 encoding LC3-mCherry fusion protein was used to target and label autophagosomes and autolysosomes in the lumbar spinal cord of HE and nTg mice aged of 6 months. Fifteen days post-infection, spinal cords were collected and lysosomes and autolysosomes were labelled with an antibody directed against cathepsin D. After detection, autophagosomes (LC3<sup>+</sup>/Cath D<sup>-</sup>) were labelled in red, lysosomes (LC3<sup>-</sup>/Cath D<sup>+</sup>) were labelled in green and autolysosomes (LC3<sup>+</sup>/Cath D<sup>+</sup>) appeared yellow (Figure 6A, B). Autophagy flux was evaluated by calculating the ratio between the number of autophagosomes and the number of LC3 positive vesicles, and the ratio between the number of autolysosomes and the number of LC3 positive vesicles. As shown in figure 6B, HE mice did not present a perturbation of autophagy flux. However, the total number of labeled autophagy-related vesicles per motor neuron was decreased in HE mice when compared to nTg mice (Figure 6C). Moreover the proportion of large autolysosomes was increased in HE mice compared to nTg while the distribution of autophagosomes size was similar between genotypes (Figure 6D).

### ***CHMP2B<sup>intron5</sup> and SOD1<sup>G86R</sup>: different alterations for different pathological mechanisms.***

We then determine whether the alterations of lysosomal pathway identified in this study were specific to CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant or common to other ALS-linked mutation. In the spinal cords of SOD1<sup>G86R</sup> mice and their nTg littermates we first measured the mRNA levels of the 8 lysosome-associated genes found deregulated in our transcriptomic analysis. At asymptomatic stage *Laptm5* mRNA level was increased in SOD1<sup>G86R</sup> mice compared to nTg mice, *Hexb* and *Slc11a1* mRNA levels were decreased and expression of the other genes tested was unchanged. At the same stage in CHMP2B<sup>intron5</sup> mice, mRNA fold change of *Cd68*, *Ctsd*, *Ctss*, *Ctsz*, *Hexb*, *Laptm5* and *Slc11a1* were increased and *Gnptab* mRNA levels were decreased when compared to nTg mice (Figure 7A). In contrast, at end stage in SOD1<sup>G86R</sup> mice, mRNA levels of *Cd68*, *Ctsd*, *Ctss*, *Ctsz*, *Hexb*, *Laptm5* and *Slc11a1* were up-regulated and *Gnptab* mRNA levels were comparable to nTg mice. At the same stage, in CHMP2B<sup>intron5</sup> model, *Cd68*, *Ctsd*, *Ctsz*, *Laptm5* and *Slc11a1* were over-expressed while *Gnptab* expression was decreased (Figure 7B). Therefore at end stage, 5 out of the 8 studied genes were commonly deregulated in both models.

We then investigated the distribution of CathD<sup>+</sup> positive vesicles in spinal cord of SOD1<sup>G86R</sup> mice at end stage. As shown in figure 7C, the pattern of CathD immunostaining was comparable between genotypes.

## **Discussion**

Autophagy, a cellular process leading to the degradation of organelles and cytosolic protein aggregates, is one of the most studied processes in neurodegenerative diseases. Indeed, a common

characteristic of the neurodegenerative diseases is the presence of protein aggregates in the soma of neurons possibly due to alterations of autophagy. Functions of wild-type CHMP2B are mainly related to its involvement in membrane fission thus participating to the endolysosomal and autophagy pathways. However, mechanisms by which CHMP2B mutants and CHMP2B<sup>intron5</sup> in particular will lead to autophagy dysfunction are not clearly understood. In this study performed in a mouse model expressing CHMP2B<sup>intron5</sup> and developing an ALS-FTD phenotype, we showed for the first time that at early stage of the disease, prior motor symptoms, expression of genes involved in lysosome functions (enzymes, membrane transporters) were up regulated suggesting an increase of the lysosomal activity. Previous studies including our have shown that CHMP2B<sup>intron5</sup> expressed in mouse leads to accumulation of P62 and ubiquitin inclusions early in the course of the disease [26, 33]. These types of inclusions are also found in neurons from patients [17]. In this study we show that these P62 and ubiquitin inclusions colocalize with large cathepsin D positive structures corresponding to autolysosomes and that these autolysosomes accumulated in motor neurons as motor symptoms progress. However, we did not observe any perturbation of autophagy flux showing that fusion between autophagosome and autolysosome is not altered by the expression of CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant in our conditions. Our results seem in contradiction with results obtained *in vitro* by other groups whose suggested that CHMP2B<sup>intron5</sup> expression alters the fusion between autophagosomes and lysosomes [22, 24, 34]. However, this discrepancy can be due to the type of quantification performed. Indeed these studies were only based on the accumulation of LC3 positive vesicles that could be either autophagosomes or autolysosomes and not by measuring the autophagic flux. This could possibly lead to a misinterpretation of the results. Our results also indicate that, in CHMP2B<sup>intron5</sup> mice, protein inclusions are taken over by the autophagy machinery to be imported into the autolysosomes. This accumulation of large autolysosomes could be the consequence of an increase of pathological inclusions formation associated with an inability of the lysosomal enzymes to eliminate these large inclusions. This hypothesis is supported by the presence of cathepsin D in the insoluble fraction corresponding to protein aggregates in which cathepsin D will be inactive. Interestingly we also noticed a progressive decreased expression of genes involved in early steps of the autophagy process (*beclin1*, *Ulk1*, *Atg12*, *Hsc70*) and a global decreased number of autophagy-related vesicles (autophagosome, lysosomes, autolysosomes) in neurons of transgenic mice. These two results tend to indicate a repression of autophagy. This repression could be a consequence of the inability of lysosome to degrade soluble or insoluble proteins.

In addition, among the 8 deregulated genes associated to the lysosome, the only repressed gene is *Gnptab*. This gene encoded the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase. This enzyme is fundamental for addressing the enzymes to the lysosome by addition of mannose-6-phosphate markers on the enzymes [35] (Fig 8A). *Gnptab* mutations are responsible for mucopolisaccharidosis II/III, a systemic disease affecting the cognition and the development, which leads to death before the

end of childhood [36]. Post-mortem analysis of tissue from mucopolysaccharidosis patients carrying a loss of function mutation in the *GNPTAB* gene showed an accumulation of large lysosomes in neurons and glial cells [37]. In addition, transgenic mice expressing the same mutant exhibit an accumulation of large lysosomes associated with weight loss, decrease of muscle strength, gait alteration and induction of inflammation markers as shown in *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mouse models [38, 39]. In fibroblasts of mucopolysaccharidosis patients activity of N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase represents only 10 to 20 percent of controls [40]. In spinal cords of *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mice *Gnptab* expression is decreased by 40% at asymptomatic stage and 30% at end stage compared to controls. As in mucopolysaccharidosis II or III, neurons from *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mice present an increase of poly-ubiquitin and P62 proteins, defective autolysosome degradation and no alteration of autophagosome formation, in contrast to other lysosomal storage diseases [41]. Nevertheless, the decrease of autophagosome and lysosome number could be explained by the repression of autophagy process. Moreover lysosomes and autophagosomes in transgenic neurons trend to fuse with each other to form a very large structure, leading to a decrease of the number of vesicles without any decrease of quantity of LC3 or P62 proteins. In addition, conversely to mucopolysaccharidosis II/III cases, the degradation by lysosomal acid hydrolases is not completely blocked but markedly diminished in *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mice. Therefore, this decrease of *Gnptab* expression could lead to an impairment of acidic hydrolases targeting and a decrease of lysosome degradation capacity (Figure 8B). This hypothesis is highly supported by the results obtained in the *SOD1*<sup>G86R</sup> model. Indeed, *SOD1*<sup>G86R</sup> transgenic mice present with a late induction of all lysosome-related gene tested (Fig 7B) except *Gnptab* whose expression is unchanged. Moreover, in contrast to *CHMP2B*<sup>intron5</sup> expressing neurons, *SOD1*<sup>G86R</sup> neurons do not present with accumulation of autolysosomes. Therefore, the role of GNPTAB could be of prime importance in the lysosomal storage disorder observed *CHMP2B*<sup>intron5</sup> patients.

Perturbations of autophagy process are described in ALS and FTD. These perturbations can be separated in two classes: mutations leading to a decrease of autophagy process like with *FUS* or *TDP43* [42, 43] and other mutations associated with a blockade of autophagy process like *CHMP2B*, *PGRN* or *SOD1* [44-46]. In the first class of genes, a stimulation of autophagy is sufficient to increase the clearance of protein aggregates [47-50]. However, in the second class of genes, a direct induction of autophagy process seems inefficient if no deleterious [46]. Therefore, the exact mechanisms leading to neurodegeneration remain to be elucidating.

Finally, in ALS and FTD diseases, *CHMP2B* present a particular profile. Firstly, among different classes of protein inclusions found in FTD, *CHMP2B* is the only gene responsible to the formation of UPS (ubiquitin proteasome system) aggregates, containing at least P62 and ubiquitin proteins. The other mutated genes lead to the formation of TDP43, TAU or FUS positives aggregates [12]. Moreover, in most ALS or FTD cases, autophagy perturbations are limited to a decrease of process intensity [42, 51] or an increase of material to degrade (e.g *SOD1* aggregates). However, in *CHMP2B*



mutants, as in *PGRN* mutants, autophagy process is blocked in final step and autolysosome becomes garbage that cannot be eliminated [52]. Finally, in *CHMP2B* mutant, autophagy alterations appear very early and could be a direct cause of motoneurons and frontotemporal degenerations. Understanding more precisely how these alterations lead to neurodegeneration will help to develop new therapeutic strategies to treat this incurable disease linked with *CHMP2B* mutants.

## **References**

- 1 Harper L, Fumagalli GG, Barkhof F, et al. MRI visual rating scales in the diagnosis of dementia: evaluation in 184 post-mortem confirmed cases. *Brain*. 2016; 139: 1211-25
- 2 Rogalski E, Cobia D, Harrison TM, et al. Progression of language decline and cortical atrophy in subtypes of primary progressive aphasia. *Neurology*. 2011; 76: 1804-10
- 3 Rohrer JD, Nicholas JM, Cash DM, et al. Presymptomatic cognitive and neuroanatomical changes in genetic frontotemporal dementia in the Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI) study: a cross-sectional analysis. *Lancet Neurol*. 2015; 14: 253-62
- 4 Bang J, Spina S and Miller BL. Frontotemporal dementia. *Lancet*. 2015; 386: 1672-82
- 5 Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, et al. Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology*. 2005; 65: 586-90
- 6 DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011; 72: 245-56
- 7 Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. 2009; 323: 1208-1211
- 8 Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009; 323: 1205-8
- 9 Benajiba L, Le Ber I, Camuzat A, et al. TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol*. 2009; 65: 470-3
- 10 Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2008; 319: 1668-72
- 11 Rubino E, Rainero I, Chio A, et al. SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2012; 79: 1556-62
- 12 Ling SC, Polymenidou M and Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*. 2013; 79: 416-38
- 13 Lewis CA, Manning J, Rossi F, et al. The Neuroinflammatory Response in ALS: The Roles of Microglia and T Cells. *Neurol Res Int*. 2012; 2012: 803701
- 14 Hu WT, Chen-Plotkin A, Grossman M, et al. Novel CSF biomarkers for frontotemporal lobar degenerations. *Neurology*. 2010; 75: 2079-86
- 15 Hallmann AL, Arauzo-Bravo MJ, Mavrommatis L, et al. Astrocyte pathology in a human neural stem cell model of frontotemporal dementia caused by mutant TAU protein. *Sci Rep*. 2017; 7: 42991
- 16 Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, et al. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet*. 2005; 37: 806-8

- 17 Parkinson N, Ince PG, Smith MO, et al. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology*. 2006; 67: 1074-7
- 18 Urwin H, Ghazi-Noori S, Collinge J, et al. The role of CHMP2B in frontotemporal dementia. *Biochem Soc Trans*. 2009; 37: 208-12
- 19 Henne WM, Buchkovich NJ and Emr SD. The ESCRT pathway. *Dev Cell*. 2011; 21: 77-91
- 20 Brown RH and Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017; 377: 162-172
- 21 van der Zee J, Urwin H, Engelborghs S, et al. CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Hum Mol Genet*. 2008; 17: 313-22
- 22 Urwin H, Authier A, Nielsen JE, et al. Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 2228-38
- 23 Lu Y, Zhang Z, Sun D, et al. Syntaxin 13, a genetic modifier of mutant CHMP2B in frontotemporal dementia, is required for autophagosome maturation. *Mol Cell*. 2013; 52: 264-71
- 24 Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, et al. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol*. 2007; 179: 485-500
- 25 Han JH, Ryu HH, Jun MH, et al. The functional analysis of the CHMP2B missense mutation associated with neurodegenerative diseases in the endo-lysosomal pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 421: 544-9
- 26 Vernay A, Therreau L, Blot B, et al. A transgenic mouse expressing CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet*. 2016; 25: 3341-3360
- 27 Castillo K, Valenzuela V, Matus S, et al. Measurement of autophagy flux in the nervous system in vivo. *Cell Death Dis*. 2013; 4: e917
- 28 Elrick MJ, Yu T, Chung C, et al. Impaired proteolysis underlies autophagic dysfunction in Niemann-Pick type C disease. *Hum Mol Genet*. 2012; 21: 4876-87
- 29 Kim D, Pertea G, Trapnell C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*. 2013; 14: R36
- 30 Langmead B and Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012; 9: 357-9
- 31 Anders S, Pyl PT and Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015; 31: 166-9
- 32 Love MI, Huber W and Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15: 550
- 33 Ghazi-Noori S, Froud KE, Mizielinska S, et al. Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain*. 2012; 135: 819-32
- 34 Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, et al. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol*. 2007; 17: 1561-7
- 35 Qian Y, Lee I, Lee WS, et al. Functions of the alpha, beta, and gamma subunits of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J Biol Chem*. 2010; 285: 3360-70

- 36 Qian Y, van Meel E, Flanagan-Steet H, et al. Analysis of mucopolipidosis II/III GNPTAB missense mutations identifies domains of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase involved in catalytic function and lysosomal enzyme recognition. *J Biol Chem.* 2015; 290: 3045-56
- 37 Kerr DA, Memoli VA, Cathey SS, et al. Mucopolipidosis type III alpha/beta: the first characterization of this rare disease by autopsy. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135: 503-10
- 38 Kollmann K, Damme M, Markmann S, et al. Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucopolipidosis II 'knock-in' mice. *Brain.* 2012; 135: 2661-75
- 39 Paton L, Bitoun E, Kenyon J, et al. A novel mouse model of a patient mucopolipidosis II mutation recapitulates disease pathology. *J Biol Chem.* 2014; 289: 26709-21
- 40 Leroy JG, Sillence D, Wood T, et al. A novel intermediate mucopolipidosis II/IIIalpha/beta caused by GNPTAB mutation in the cytosolic N-terminal domain. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22: 594-601
- 41 Lieberman AP, Puertollano R, Raben N, et al. Autophagy in lysosomal storage disorders. *Autophagy.* 2012; 8: 719-30
- 42 Soo KY, Sultana J, King AE, et al. ALS-associated mutant FUS inhibits macroautophagy which is restored by overexpression of Rab1. *Cell Death Discov.* 2015; 1: 15030
- 43 Xia Q, Wang H, Hao Z, et al. TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion. *EMBO J.* 2016; 35: 121-42
- 44 Tanaka Y, Chambers JK, Matsuwaki T, et al. Possible involvement of lysosomal dysfunction in pathological changes of the brain in aged progranulin-deficient mice. *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 2: 78
- 45 Valdez C, Wong YC, Schwake M, et al. Progranulin-mediated deficiency of cathepsin D results in FTD and NCL-like phenotypes in neurons derived from FTD patients. *Hum Mol Genet.* 2017; 26: 4861-4872
- 46 Nassif M, Valenzuela V, Rojas-Rivera D, et al. Pathogenic role of BECN1/Beclin 1 in the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy.* 2014; 10: 1256-71
- 47 Wang IF, Guo BS, Liu YC, et al. Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 15024-9
- 48 Chang CF, Lee YC, Lee KH, et al. Therapeutic effect of berberine on TDP-43-related pathogenesis in FTL and ALS. *J Biomed Sci.* 2016; 23: 72
- 49 Lopez A, Lee SE, Wojta K, et al. A152T tau allele causes neurodegeneration that can be ameliorated in a zebrafish model by autophagy induction. *Brain.* 2017; 140: 1128-1146
- 50 Ryu HH, Jun MH, Min KJ, et al. Autophagy regulates amyotrophic lateral sclerosis-linked fused in sarcoma-positive stress granules in neurons. *Neurobiol Aging.* 2014; 35: 2822-2831
- 51 Bose JK, Huang CC and Shen CK. Regulation of autophagy by neuropathological protein TDP-43. *J Biol Chem.* 2011; 286: 44441-8
- 52 Gotzl JK, Colombo AV, Fellerer K, et al. Early lysosomal maturation deficits in microglia triggers enhanced lysosomal activity in other brain cells of progranulin knockout mice. *Mol Neurodegener.* 2018; 13: 48

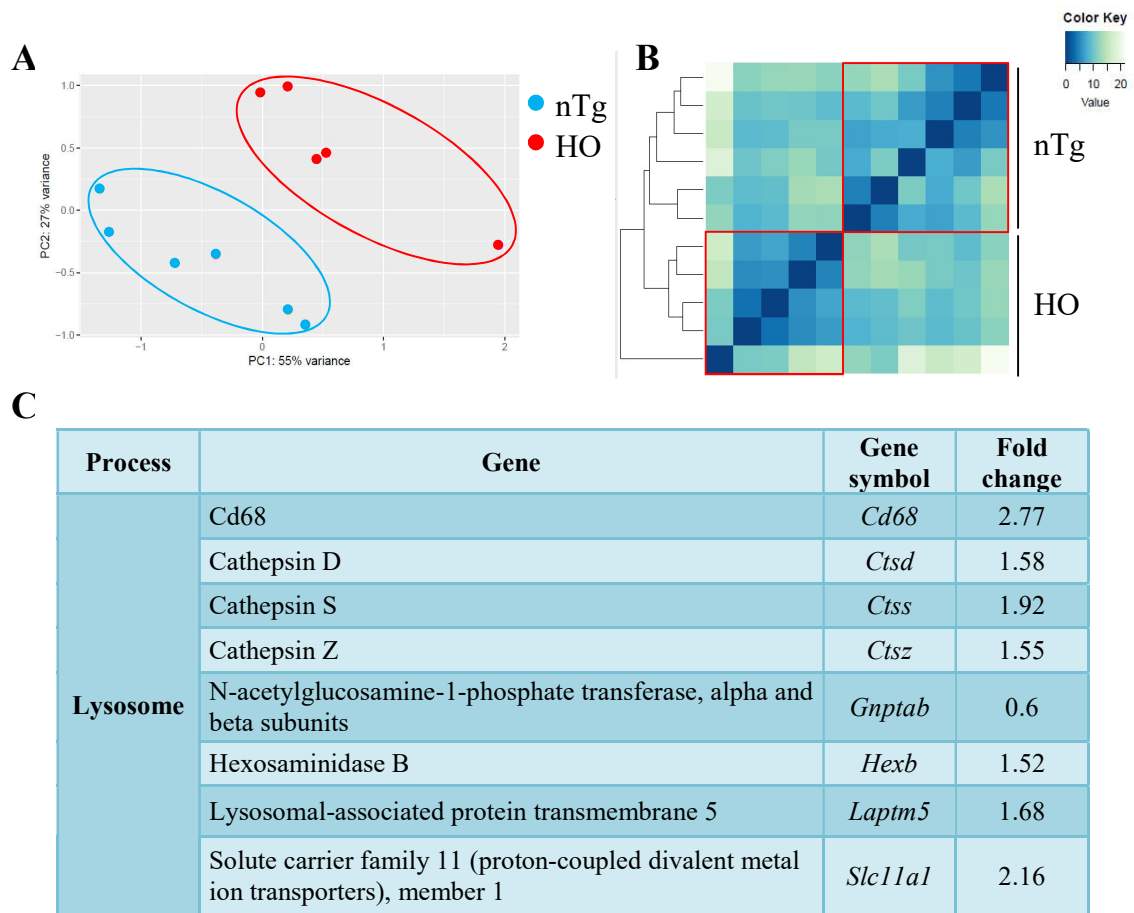


Figure 1: Lysosome-related genes are deregulated in  $CHMP2B^{intron5}$  transgenic mice.

A. Principal component analysis performed on lumbar spinal cord of homozygous (HO) mice compared to non transgenic (nTg) littermates at asymptomatic stage (45 days) with lysosome-related genes showing a transcriptomic signature dependent of the genotype.

B. Heatmap and hierachical clustering analysis profiles of HO and nTg mice at asymptomatic stage with genes associated with lysosomes highlight a genotype-related clustering.

C. Table presenting the 8 most deregulated genes associated with the lysosome.

Wald test adjusting for multiple tests. nTg: n=6 , HO: n=5.

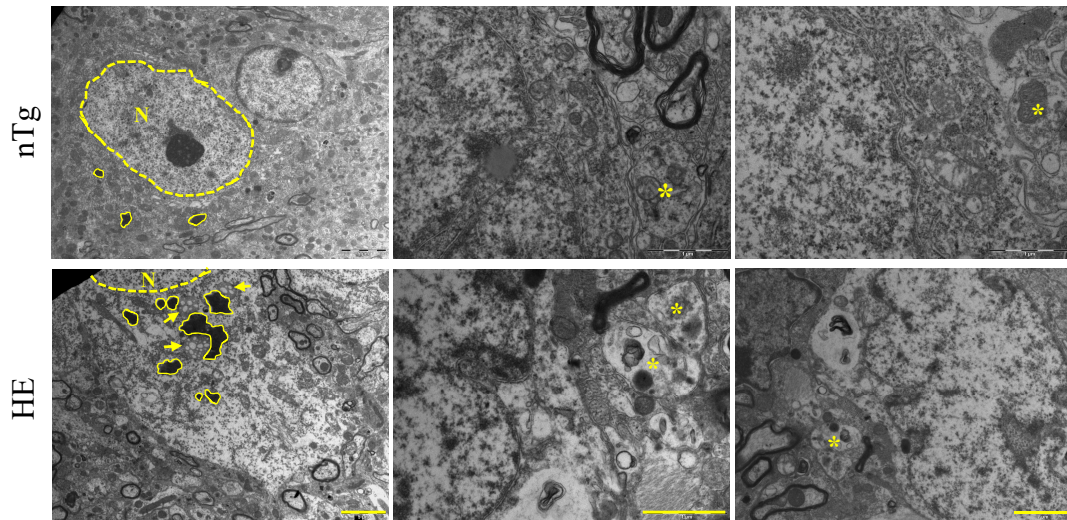


Figure 2: Abnormal accumulation of multivesicular bodies and electron-dense structures in  $CHMP2B^{intron5}$  motor neurons.

Lower motoneurons expressing  $CHMP2B^{intron5}$  present with an accumulation of multivesicular bodies (yellow arrows) and electron-dense structures (surrounded in yellow) compared to non transgenic (nTg) mice at 18 months of age. However, density and size of autophagosomes are comparable between heterozygous (HE) and nTg mice (yellow asterisks). Scale bar: left= 5µm; center=1µm; right=2µm. N=nucleus.

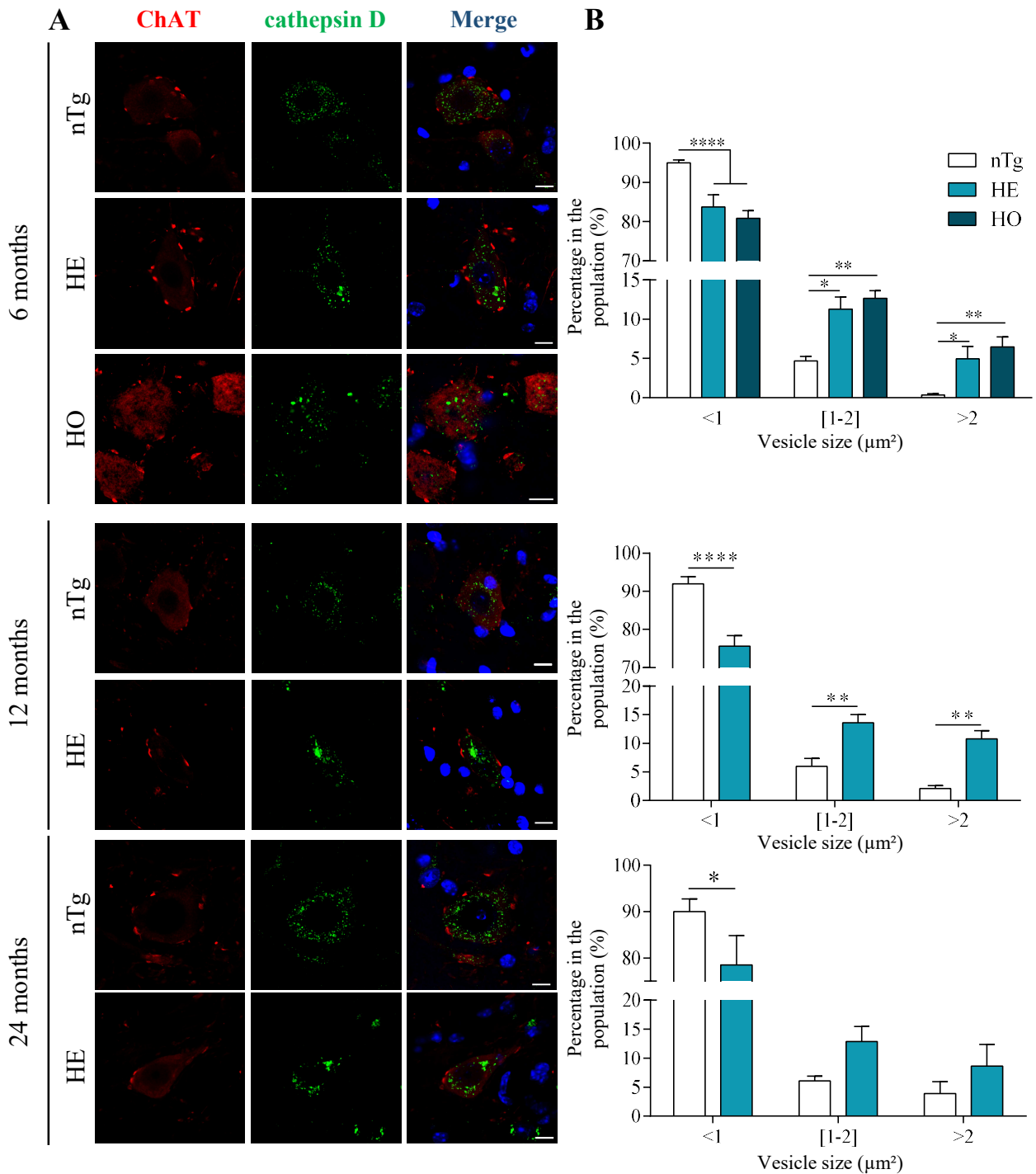


Figure 3: *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mutant expression leads to an increase of large cathepsinD positive vesicles proportion from early stage.

A. Double immunolabelling with antibody against ChAT (Red) and cathepsin D (green) at 6 (top), 12 (middle) and 24 months of age (bottom).

B. Quantifications of the size of lysosome/autolysosome positive vesicles (small, medium or large) at 6 (top), 12 (middle) and 24 months of age (bottom). Graphs represent mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , Two way ANOVA followed by uncorrected Fischer's LSD or t test.  $n=4$  per genotype.

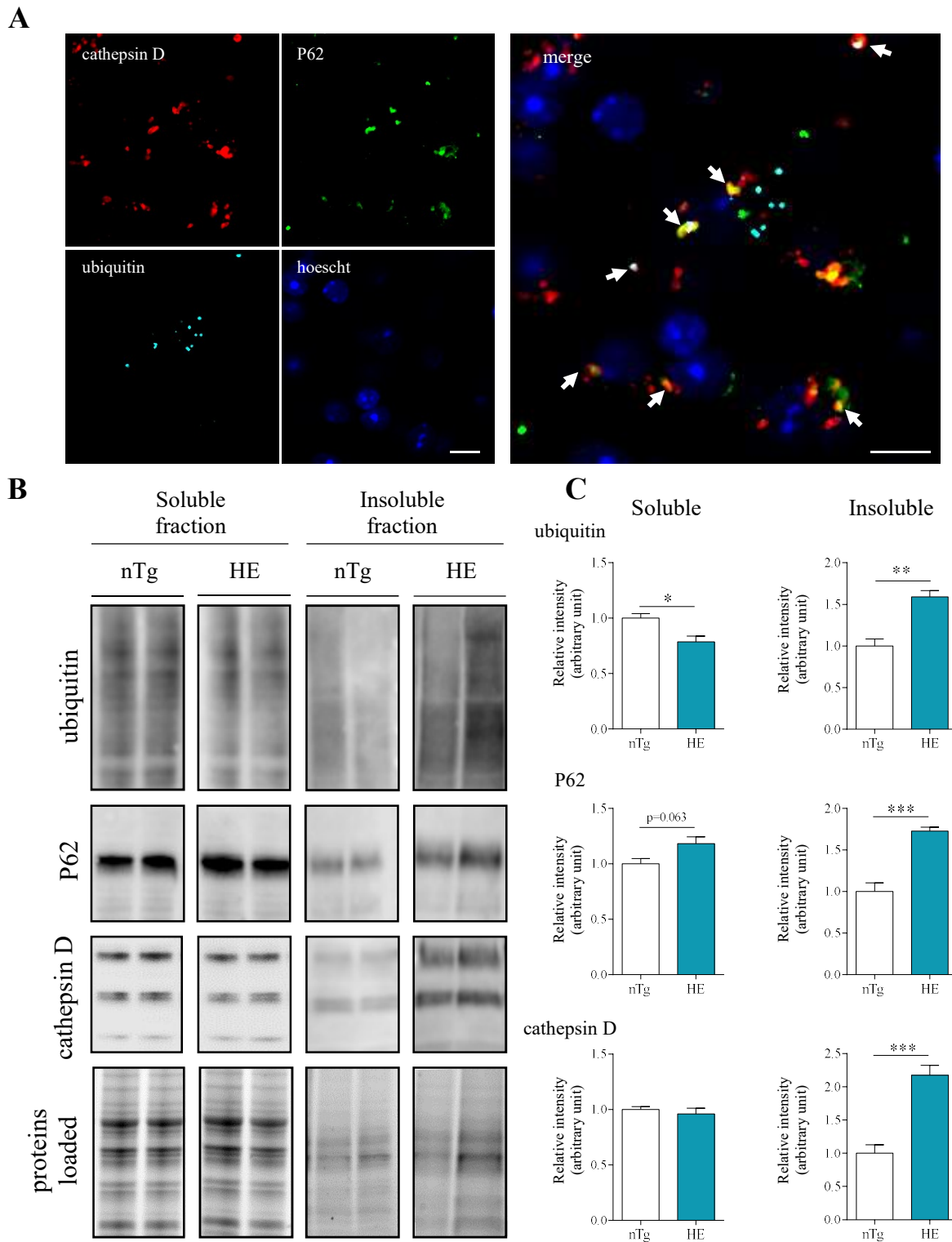


Figure 4: CHMP2B<sup>intron5</sup> mice present with a precocious accumulation of autolysosomes containing insoluble aggregates

A. Immunostaining in lower motor neurons of 12 months-old heterozygous (HE) mice with cathepsin D (red), P62 (green) and ubiquitin (cyan) antibodies. Nuclei were labelled with Hoescht. Scale bar: 10 $\mu$ m.

B. Representative Western blot showing ubiquitin, P62, cathepsin D and loaded proteins in soluble or insoluble fraction from brain extracts of 12 months-old HE and non transgenic (nTg) mice.

C. Quantification by densitometry of ubiquitin, P62 and cathepsin D from soluble and insoluble fractions. Graphs represent mean fold change $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , t test. n=4 per genotype.



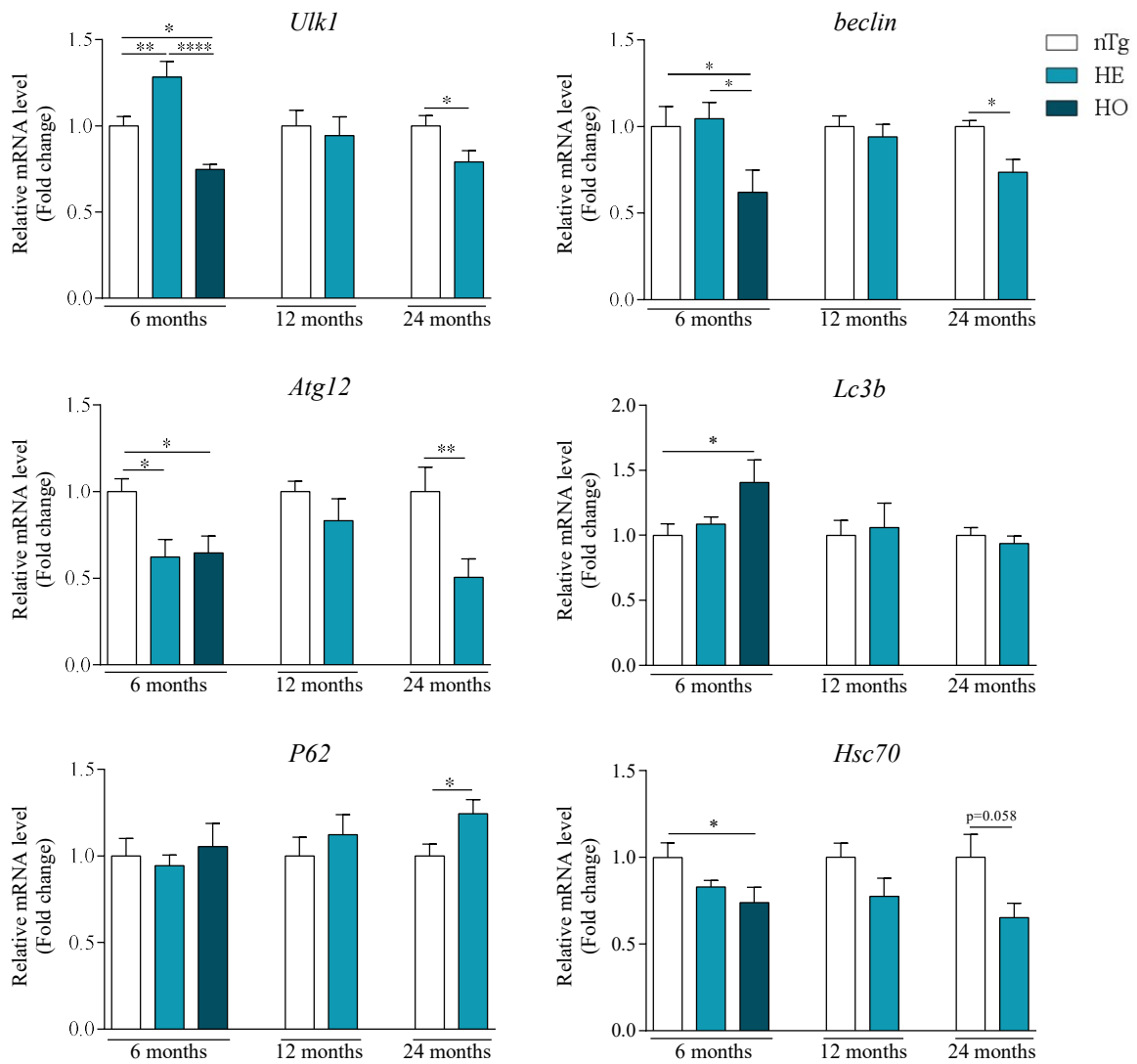


Figure 5: CHMP2B<sup>intron5</sup> mice present with a late repression of autophagy process. Quantification of autophagy-related genes mRNA levels in lumbar spinal cord of non transgenic (nTg), heterozygous (HE) and homozygous (HO) mice at 6, 12 and 24 months of age. Graphs represent mean fold change $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , one way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD or t test. n=6-7 per genotype.

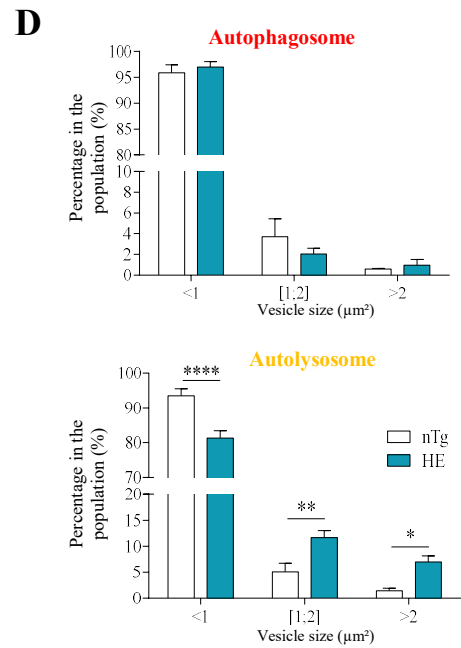
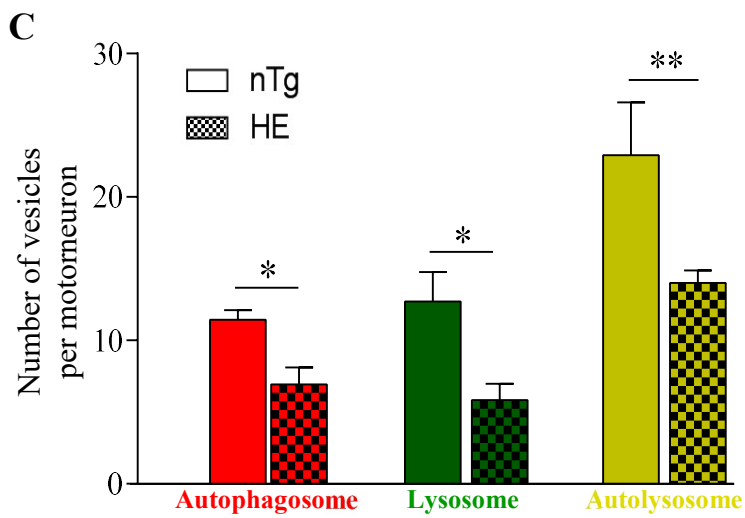
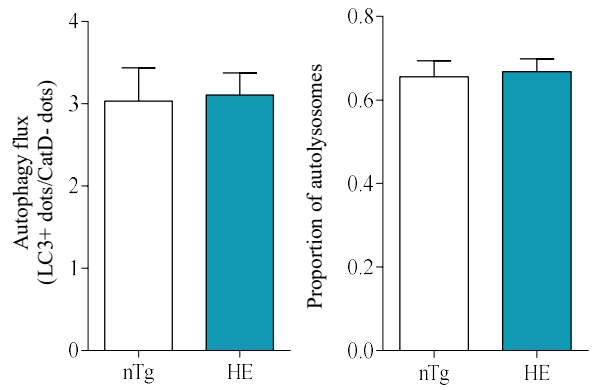
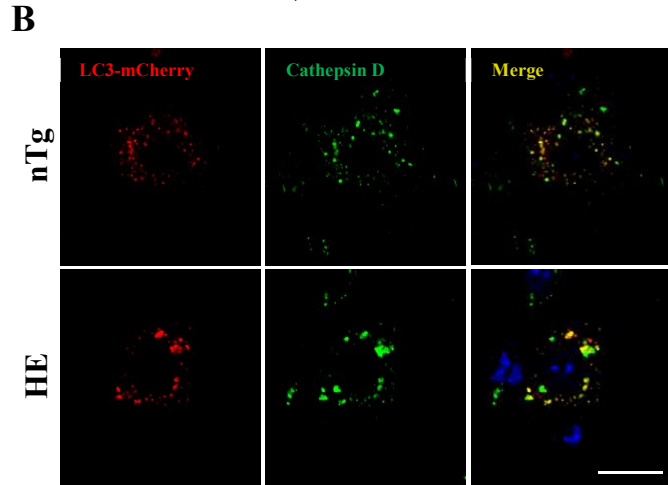
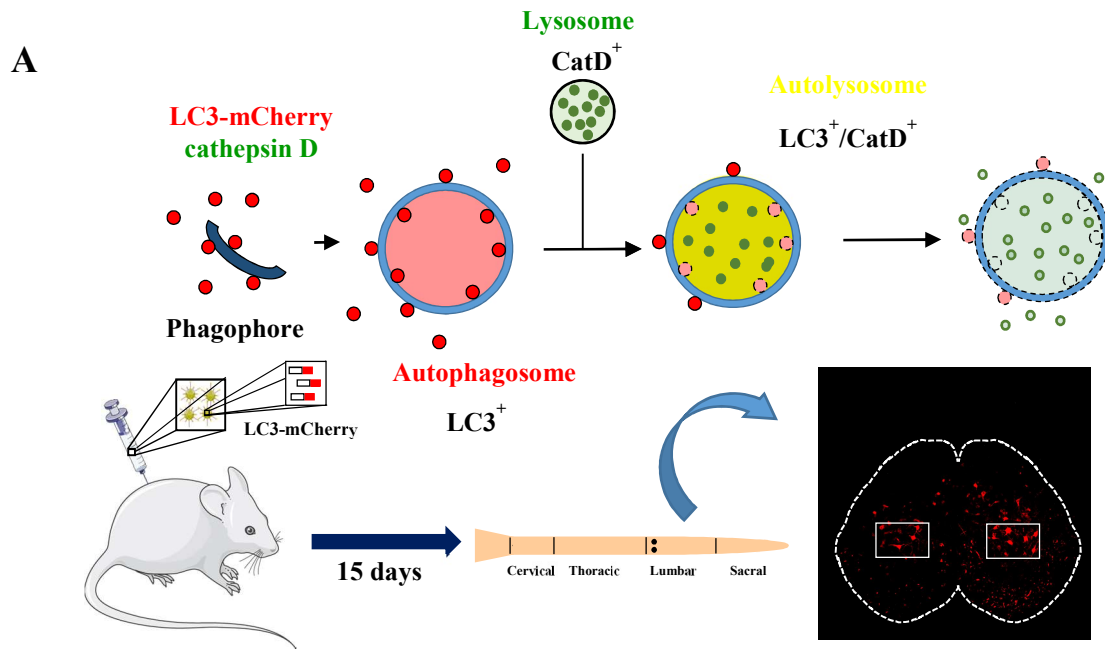


Figure 6: *CHMP2B<sup>intron5</sup>* expression induces a repression of autophagy structures formation without affecting the autophagy flux.

A. Experimental design of autophagy flux study. AAV2.2 encoding LC3-mCherry protein was injected in lumbar spinal cord of non transgenic (nTg) and transgenic (HE) at 6 months of age. 15 days after injection, lumbar spinal cords were collected and lysosomes were labelled with an antibody anti-cathepsin D.

B. HE and nTg lower motoneurons transduced by AAV2.2 and labelled with anti-cathepsin D antibody and quantifications of autophagy flux. Scale bar=20 $\mu$ m.

C. Quantification of number of autophagosomes (red), lysosomes (green) or autolysosomes (yellow) per motoneuron.

D. Distribution of autophagosomes (up) or autolysosome (bottom) in function of their size.

Graphs represent mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , t test. nTg: n=4, HE: n=5.

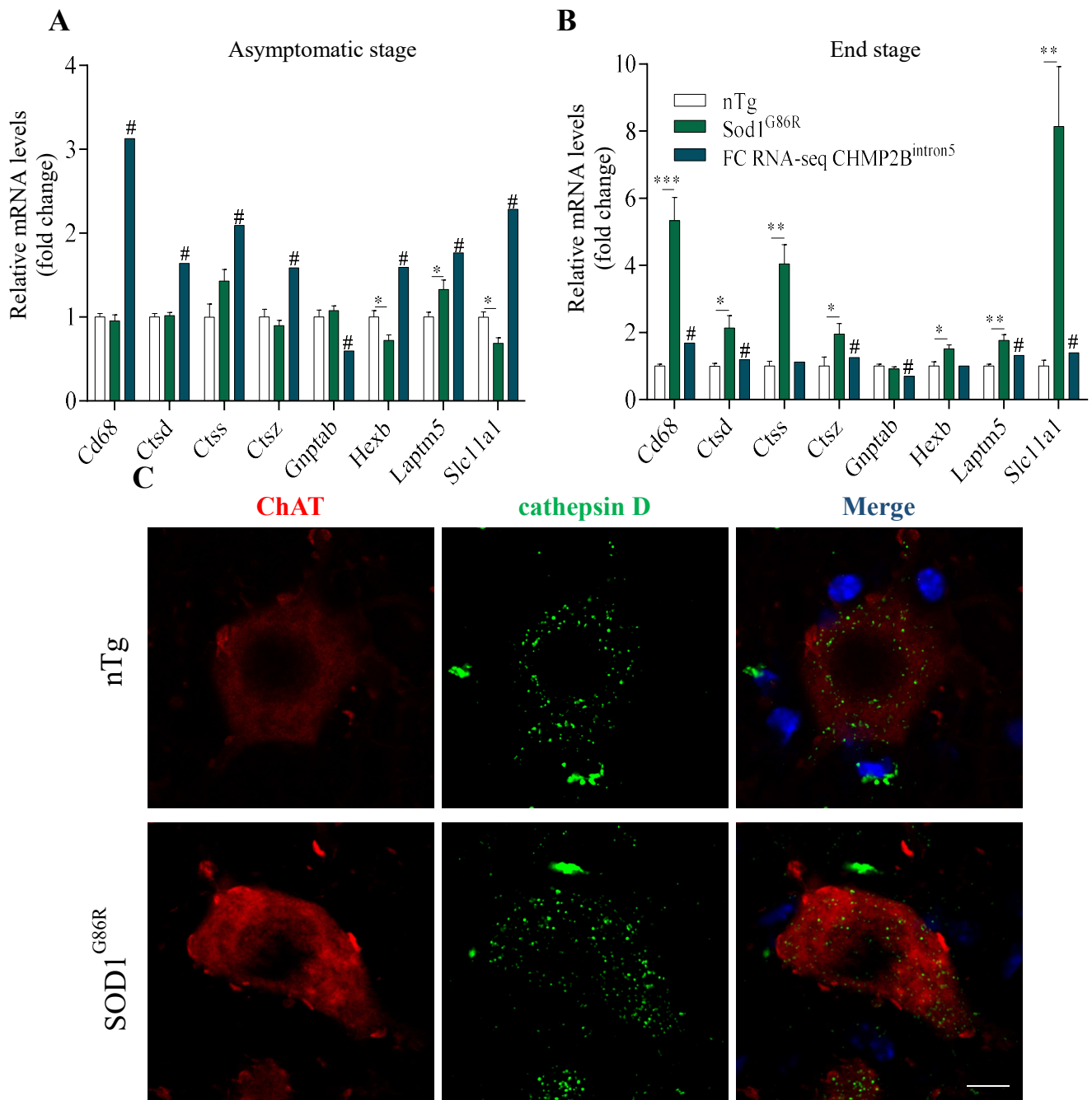


Figure 7: SOD1<sup>G86R</sup> mutant triggers late perturbation of lysosome-related genes expression.

A-B. Quantification of lysosome-related genes mRNA levels in spinal cord in SOD1<sup>G86R</sup> by qPCR and comparison with RNA-seq of CHMP2B<sup>intron5</sup> mice line at asymptomatic (A) and end stages (B).

C. Double immunolabelling with antibodies against ChAT (Red) and cathepsin D (green) at end stage (105 days) in SOD1<sup>G86R</sup> mice line. Scale bar: 10 $\mu$ m.

Graphs represent mean fold change  $\pm$  SEM for SOD1<sup>G86R</sup> mice line and fold change for CHMP2B<sup>intron5</sup> mice line. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , t test (SOD1<sup>G86R</sup> mice line) or Wald test adjusting for multiple tests (CHMP2B<sup>intron5</sup> mice line). SOD1<sup>G86R</sup>:  $n=5-7$  per genotype, CHMP2B<sup>intron5</sup>:  $n=5-6$  per genotype. #:  $p < 0.05$  between homozygous (HO) and non-transgenic (nTg) mice in RNAseq statistical analysis.

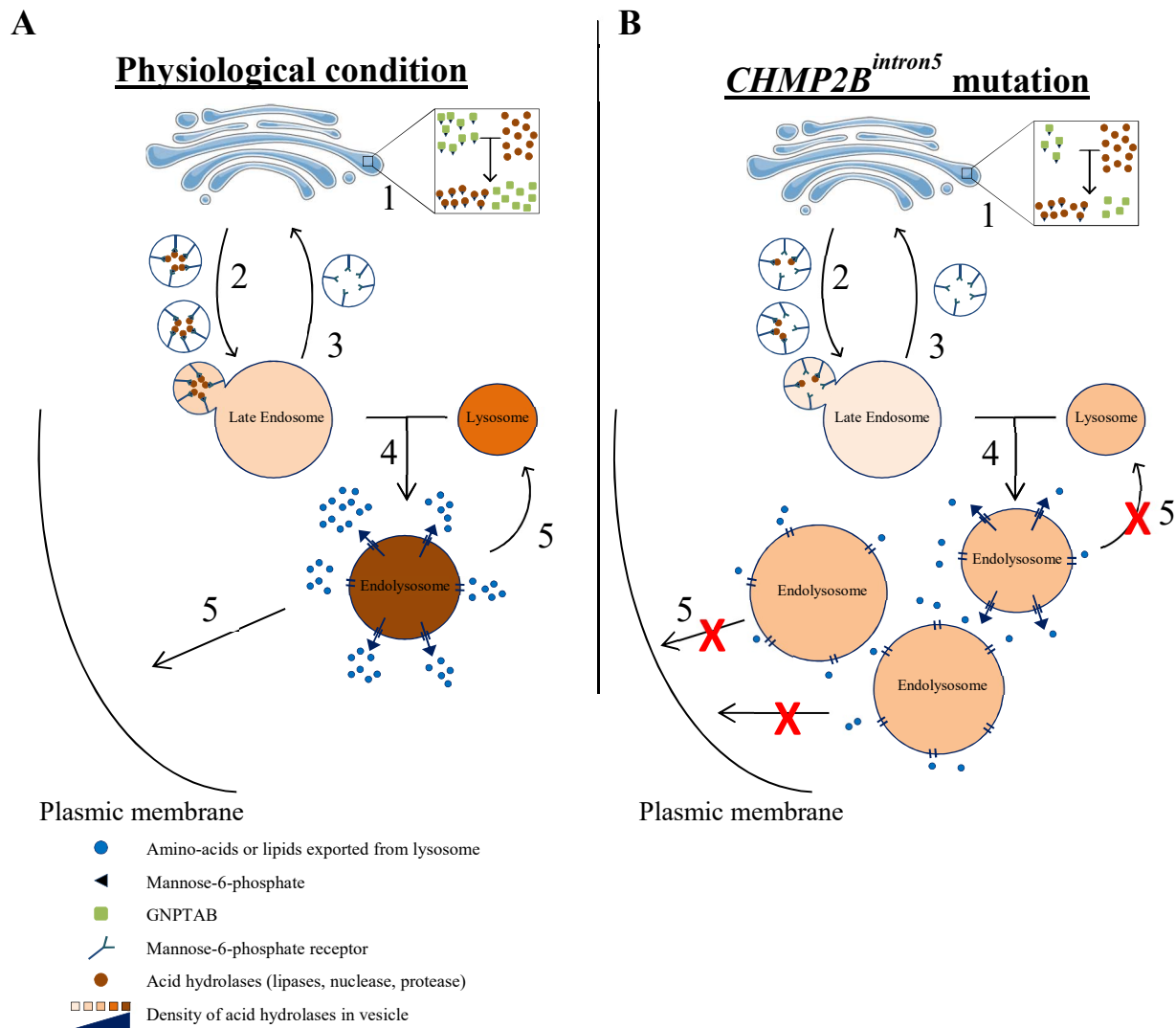
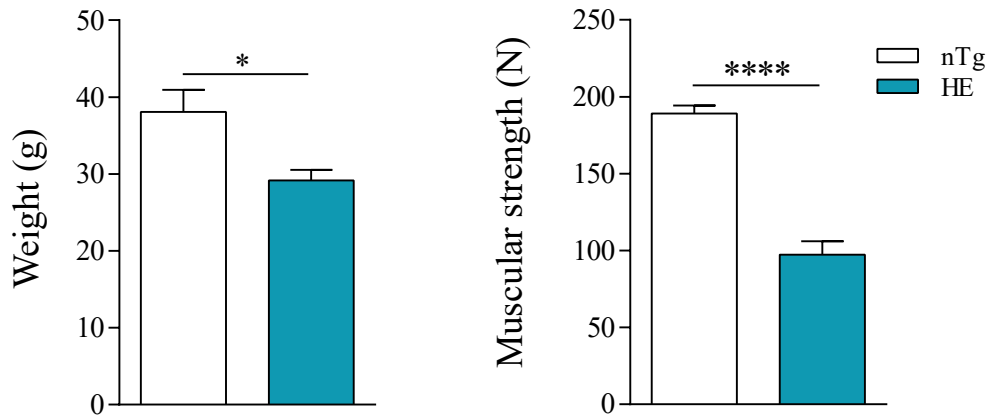


Figure 8: Hypothetic role of down expression of *GNPTAB* in the lysosomal storage disorders observed in *CHMP2B*<sup>intron5</sup> patients

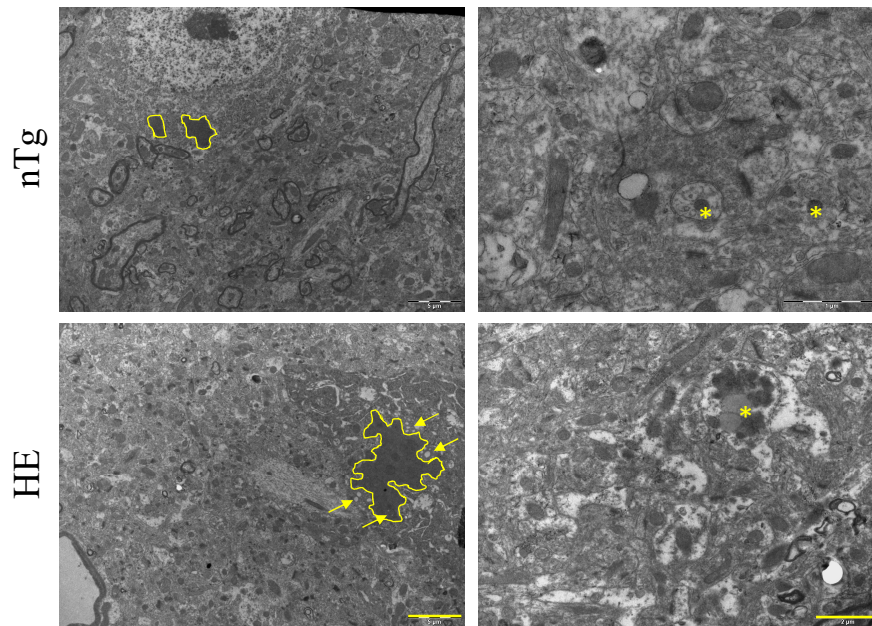
A. In physiological conditions, acid hydrolases interact with mannose-6-phosphate receptor (M6PR) in Golgi apparatus after the adding of M6P by GNPTAB enzyme (1). Acid hydrolases are directed by vesicle trafficking in late endosome where acidic pH destabilizes the liaison between acid hydrolase and M6PR (2). M6PR are recycled by retrograde trafficking toward Golgi apparatus (3). Late endosome fuses with lysosome to form endolysosome (4). Proteins, nucleic acids and lipids are degraded and their components are released in cytosol by carriers. Finally, a part of endolysosome buds to reform lysosome and another part fuses with plasmic membrane and its content is released in the extracellular space (5).

B. In neurons expressing the *CHMP2B*<sup>intron5</sup> mutant, we observed a decrease of *Gnptab* expression. This deregulation could trigger a decrease of acid hydrolase amount directed towards the late endosome and the endolysosome. The consequence would be an accumulation of undegraded lysosomal material and an accumulation of endolysosomes or autolysosomes.



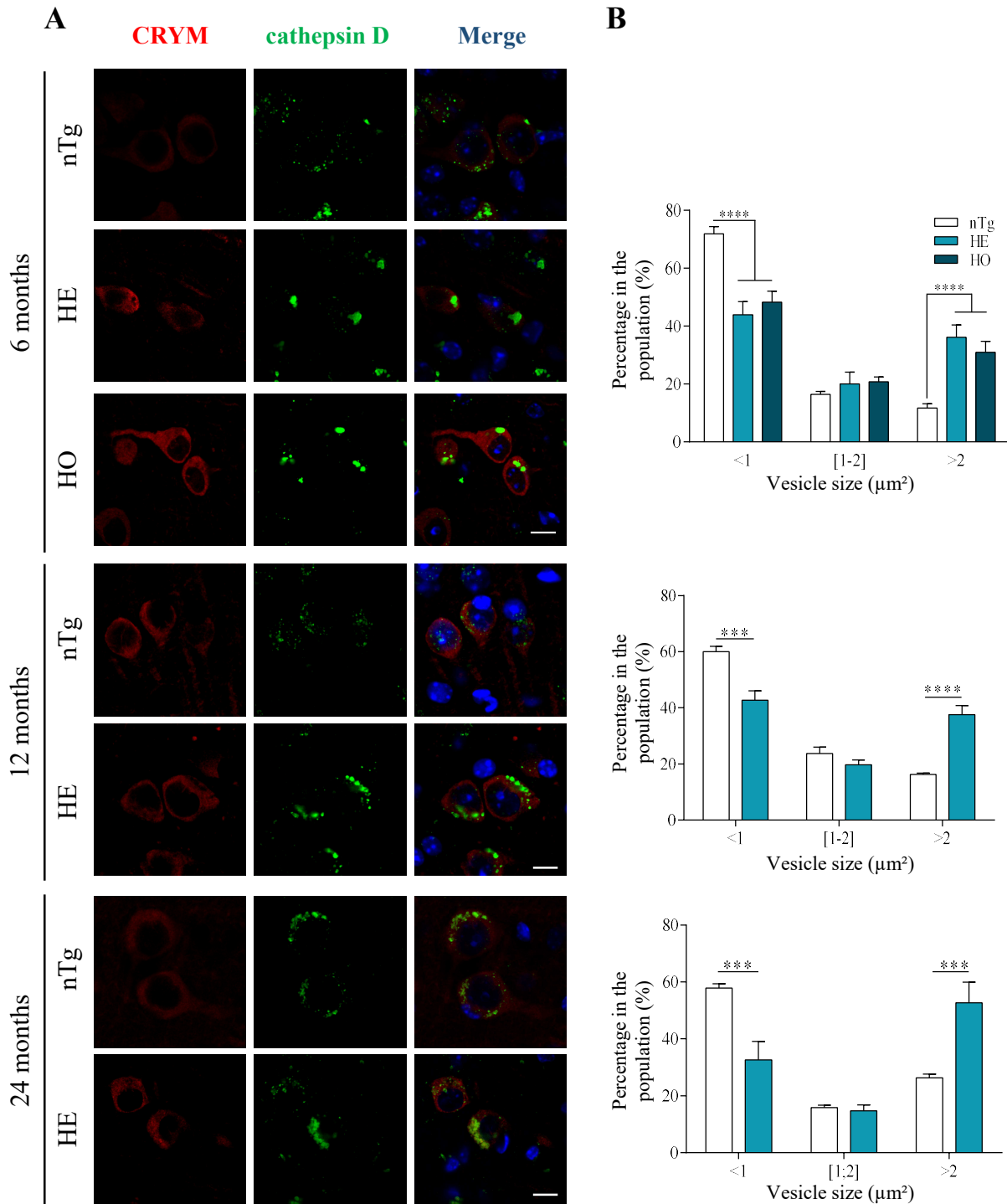
Supplemental figure 1: Heterozygous (HE) mice exhibit a loss of weight (left) and strength (right) at 18 months of age compared to littermates non transgenic (nTg) mice.

Graphs represent mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , t test. nTg: n=4 HE: n=6.



Supplemental figure 2: Neurons of frontal cortex expressing the mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* contain large electron-dense structures and multivesicular bodies.

Frontal cortex neurons expressing *CHMP2B<sup>intron5</sup>* present with an accumulation of multivesicular bodies (yellow arrows) and electron-dense structures (surrounded in yellow) compared to control mice at 18 months of age. However, number and size of autophagosomes (yellow asterisks) are unchanged between nTg and HE mice. Scale bar: left= 5µm; right=2µm. nTg: non transgenic mice, HE: heterozygous mice.

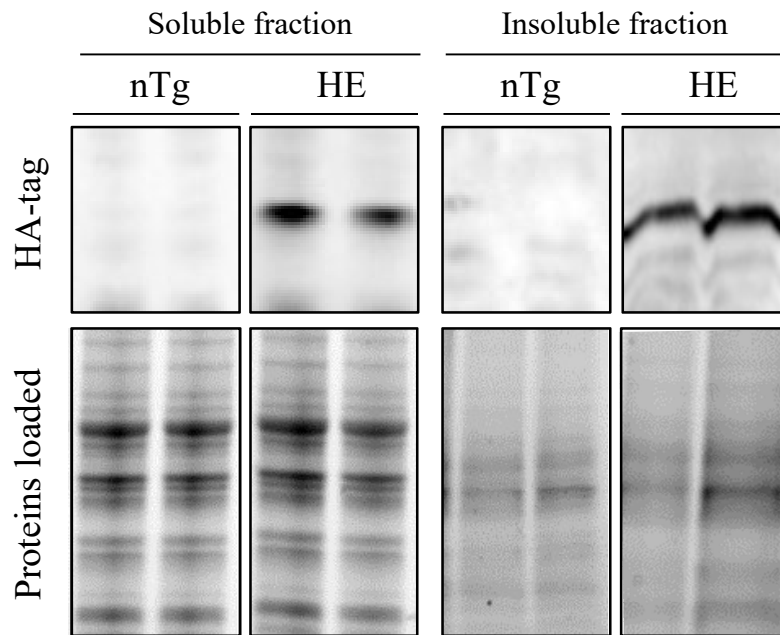


Supplemental figure 3: Transgenic mice exhibit a precocious and progressive accumulation of large lysosomes proportion in frontal cortex neurons from early stage.

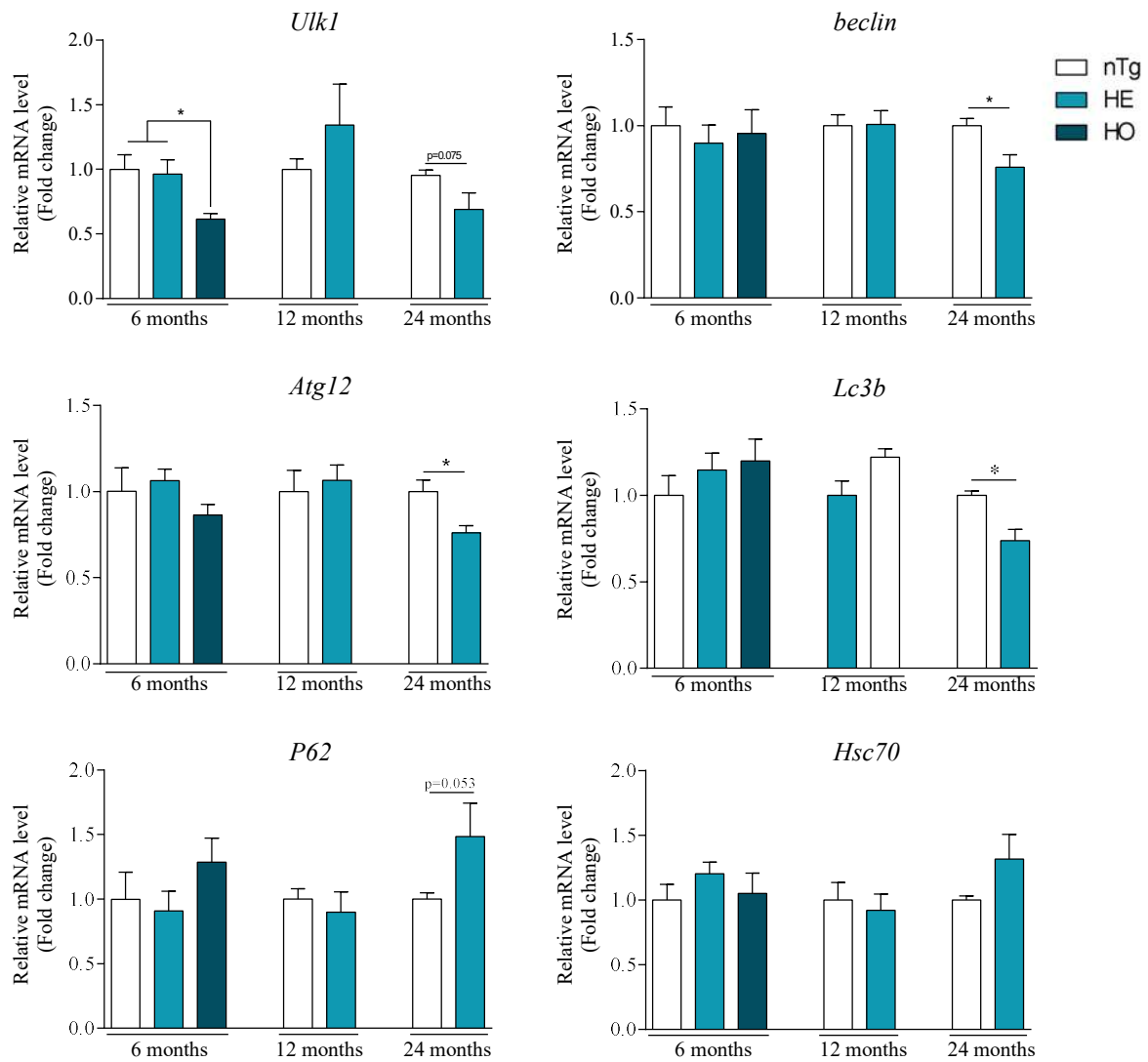
A. Double immunolabelling with antibodies against CRYM (Red) and cathepsin D (green) at 6 (top), 12 (middle) and 24 months of age (bottom).

B. Quantifications of the size of lysosome positive vesicles (small, medium or large) at 6 (top), 12 (middle) and 24 months of age (bottom). Graphs represent mean  $\pm$  SEM, \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , Two way ANOVA followed by uncorrected Fischer's LSD or t test.  $n=4$  per genotype.





Supplemental figure 4: CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant forms insoluble aggregates. Representative western blot showing CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant and loaded proteins in soluble or insoluble fraction from brain extracts.



Supplemental figure 5: Repression of genes involved in autophagy initiation in cerebral cortex of CHMP2B<sup>intron5</sup> mice.

Quantification of autophagy-related genes mRNA levels in cerebral cortex of non-transgenic (nTg), heterozygous (HE) and homozygous (HO) mice at 6, 12, 24 months of age. Graphs represent mean fold change $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$ , one way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD or t test. n=6-7 per genotype.

Gene	Forward	Reverse
<i>18s</i>	TCTGATAAATGCACGCATCC	GCCATGCATGTCTAAGTACGC
<i>Atg12</i>	CAGCACCGAAATGTCTCTGA	CCCAGACCAAGAAGTTGGAA
<i>beclin1</i>	GCCTCTGAAACTGGACACGA	TAGCCTCTTCCTCCTGGGTC
<i>Cd68</i>	GACCGCTTATAGCCCAAGGA	TCATCGTGAAGGATGGCAGG
<i>Ctsd</i>	AATCCCTCTGCGCAAGTTCA	GGGCCTTTGAGGATCAGGTC
<i>Ctss</i>	GATGGCTGTTTTGGATGCC	TCCCAATGGTAGTCCAGGGT
<i>Ctsz</i>	GACCAGGCCGTTATCAACCA	TTCGCCCCATGAATTCGGA
<i>Gnptab</i>	AAGATTGGCCCAGCCTACAC	TTTCTGGGGGAACGATCAGC
<i>Hexb</i>	GGACTTCAGCATCGACCACA	GTAATATCGCCGAAACGCCTC
<i>Hsc70</i>	TCTCGGCACCACCTACTCC	CCCGATCAGACGTTTGGC
<i>Laptm5</i>	GGACAGCAGCTCCAAGATGT	GGAGTCTTAGGGGGCAGAGA
<i>Lc3b</i>	TGACCCAGCTTAAGCGACTG	AACCACATCCTAAGGCCAGC
<i>P62</i>	AGAAACCCATGGACAGCATC	GCTCAGGAGGAGACGATGAC
<i>Pol2</i>	GCTGGGAGACATAGCACCA	TTACTCCCCTGCATGGTCTC
<i>Slc11a1</i>	GAAGGGGACAGATTGAGGAGC	GGGGGCTCTTGTCATAATCAT
<i>Tbp</i>	CAGCCAAGATTCACGGTAGAT	CCAATGACTCCTATGACCCCTA
<i>Ulk1</i>	TACACACCTTCTCCCAAGTG	GAGGAACCGGGTCGTGG

Supplementary table 1: Primer sequences used for qPCR

### III. Publication 3 : Dysfonctionnement de la jonction neuromusculaire et modification du métabolisme musculaire en réponse à l'expression neuronale du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* (en préparation)

Les atteintes motrices développées par les patients atteints de SLA sont la résultante d'altérations au niveau de différents types cellulaires notamment les motoneurons et les cellules gliales au niveau central et les fibres musculaires au niveau périphérique, qui participent au développement des symptômes associés à la SLA comme l'atrophie musculaire et les troubles de la motricité.

Dans cette étude, nous avons étudié l'impact de l'expression neuronale de *CHMP2B<sup>intron5</sup>* sur le développement de ces caractéristiques pathologiques en se focalisant sur l'axe neuromusculaire.

Nous avons tout d'abord mis en évidence des troubles progressifs de la motricité et de la posture chez les souris exprimant le mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* avec une augmentation de l'écartement des pattes postérieures et une irrégularité de la démarche. Nous avons ensuite étudié la morphologie des jonctions neuromusculaires (JNM) par microscopie électronique. Au stade symptomatique, les souris transgéniques présentent une déstructuration des JNM avec une perte des invaginations post-synaptiques. Par ailleurs, de larges structures denses aux électrons sont présentes au niveau de la partie pré-synaptique des JNM.

Des tests électrophysiologiques nous ont ensuite permis d'étudier la fonctionnalité des JNM déstructurées. Les résultats ont montré une diminution progressive de l'amplitude maximale de réponse chez les souris transgéniques lors des stimulations nerveuses répétées traduisant une altération du couplage entre les neurotransmetteurs et leurs récepteurs. Des analyses identiques chez les souris *SOD1<sup>G86R</sup>* ont montrées des altérations différentes. L'amplitude du CMAP apparait plus faible mais lors de stimulations répétées, aucune diminution de l'amplitude n'est observée, traduisant des mécanismes pathologiques différents entre les deux modèles.

Nous avons ensuite réalisé des analyses histologiques et biochimiques sur des muscles des membres postérieurs de souris transgéniques afin de déterminer l'impact de l'expression neuronale de *CHMP2B<sup>intron5</sup>* sur le muscle. Contrairement aux patients SLA, les muscles des souris transgéniques ne présentent pas d'augmentation de la proportion de fibres oxydatives. En revanche, comme dans le modèle *SOD1<sup>G86R</sup>*, nos analyses biochimiques ont montré une induction de myosines associées au métabolisme oxydatif. De plus, les souris transgéniques présentent une atrophie musculaire progressive au niveau des muscles des membres postérieurs.

Ainsi, il semblerait que l'expression neuronale du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* soit suffisante à la mise en place des principales caractéristiques présentées par les patients SLA tout en suggérant une participation d'autres types cellulaires, notamment le muscle dans le développement des symptômes moteurs liés à la SLA.

# **Altération de la jonction neuromusculaire et modification du métabolisme musculaire en réponse à l'expression neuronale du mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup>**

Waegaert R<sup>1</sup>, Dirrig-Grosh S<sup>1</sup>, Goy MA<sup>1</sup>, Loeffler JP<sup>1</sup>, René F<sup>1</sup>.

1 : Université de Strasbourg, INSERM U1118 Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence, Strasbourg, France.

## **Résumé**

CHMP2B (charged multivesicular body protein 2b), membre du complexe ESCRT-III (endosomal sorting complexes required for transport) est une protéine impliquée dans les processus de déformation membranaire indispensables dans l'autophagie et l'endocytose. En 2006, une mutation dans le gène *CHMP2B* a été découverte chez des patients atteints de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), maladie neurodégénérative entraînant une paralysie progressive des muscles squelettiques. Maladie complexe, la SLA est également une maladie dans laquelle plusieurs types cellulaires, notamment le muscle, pourraient être à l'origine des symptômes moteurs. Cependant, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à l'impact du mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> sur l'axe neuromusculaire. *CHMP2B* étant majoritairement exprimé et traduit au sein du neurone, nous avons voulu déterminer si l'expression neuronale du mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> était suffisante à la mise en place des altérations de l'axe neuromusculaire relatives à la SLA.

Les résultats que nous avons obtenus montrent une altération à la fois fonctionnelle et structurale de la jonction neuromusculaire (JNM) entraînant l'apparition progressive de troubles de la posture et de la coordination motrice. Le muscle, bien que n'exprimant pas le mutant, présente une atrophie progressive ainsi qu'une induction de l'expression de myosines associées au métabolisme oxydatif.

Ainsi, nos résultats indiquent un impact important du neurone dans le développement de la SLA. Néanmoins, l'expression du mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> au niveau des neurones ne semble pas suffisante à l'établissement de l'ensemble des caractéristiques associées à la SLA, suggérant l'implication potentielle d'un ou de plusieurs autres types cellulaires, notamment le muscle dans le développement des symptômes relatifs à la SLA.

## **Introduction**

Le gène *CHMP2B* code une protéine appartenant au complexe ESCRT-III impliqué dans l'endocytose, et plus particulièrement dans la formation de corps multivésiculaires par déformation membranaire. En 2006, une mutation dans ce gène a été découverte chez des patients atteints de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), une maladie neurodégénérative fatale caractérisée par la perte progressive des neurones moteurs et des motoneurons. La SLA entraîne une paralysie progressive des muscles squelettiques et aboutit, 2 à 5 ans après diagnostic, à l'arrêt des fonctions respiratoires.

La complexité de cette maladie tient à la large hétérogénéité des symptômes et des formes de SLA, associées à une étiologie faible. En effet, plus de 90% des cas de SLA sont sporadiques [1] pour seulement 10% de cas familiaux dans lesquels l'origine de la maladie est parfois connue.

Néanmoins, quelle que soit l'origine de la maladie, la SLA se caractérise par des altérations de la jonction neuromusculaire précédant la mort des motoneurones et une atrophie des muscles squelettiques.

De plus, la SLA est une maladie dans laquelle plusieurs types cellulaires participent au développement et à la propagation des symptômes, notamment les neurones moteurs, les motoneurones, les neurones sérotoninergiques [2], les cellules gliales [3] et les fibres musculaires [4]. En effet, il a été mis en évidence dans plusieurs modèles murins de SLA des altérations musculaires comme la formation d'agrégats protéiques [5] ainsi que l'induction d'un stress oxydatif [6, 7] associé à des dysfonctionnements mitochondriaux [8].

Cependant, ces altérations musculaires pourraient être la conséquence d'une altération au niveau des motoneurones innervant les fibres musculaires aussi bien que de l'expression du mutant au sein même du muscle.

Ainsi, à partir d'un modèle murin exprimant le mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> spécifiquement dans les neurones, l'objectif de cette étude est de déterminer quelles sont les conséquences de cette expression neuronale de *CHMP2B*<sup>intron5</sup> sur le phénotype moteur des souris et la fonctionnalité de la JNM. Deux études ont préalablement montré que l'expression neuronale de ce mutant entraînait une diminution progressive de la force musculaire et de l'endurance [9] ainsi qu'une dénervation partielle des muscles squelettiques [10]. Nous nous proposons ici d'étudier plus en détail la structure de l'axe neuromusculaire des souris *CHMP2B*<sup>intron5</sup> par microscopie électronique ainsi que la fonctionnalité de la JNM par électrophysiologie.

Les résultats obtenus montrent que l'expression neuronale de *CHMP2B*<sup>intron5</sup> entraîne l'apparition de troubles de la posture et de la coordination motrice. A un stade avancé de la pathologie, les souris transgéniques présentent des altérations de la JNM avec une perte des invaginations post-synaptiques et une perturbation de la distribution des vésicules synaptiques au niveau pré-synaptique. De plus, des tests électrophysiologiques ont mis en lumière des altérations fonctionnelles de la JNM. Enfin, comme observé chez les patients, les souris transgéniques présentent une induction de l'expression de myosines associées au métabolisme oxydatif ainsi qu'une atrophie des muscles des membres postérieurs.

Ainsi, nos résultats suggèrent une forte toxicité neuronale de *CHMP2B*<sup>intron5</sup> entraînant des altérations à la fois neuronales et musculaires. Cependant, l'absence de certaines caractéristiques présentes chez les patients SLA soulève l'hypothèse d'une potentielle toxicité de *CHMP2B*<sup>intron5</sup> au niveau musculaire.

## **Matériel et Méthodes**

L'ensemble des procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec les directives institutionnelles et nationales et approuvées par le comité d'éthique de l'Université de Strasbourg (CREMEAS) ainsi que par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche sous les numéros AL/51/58/02/13 APAFIS#9494-2017040316393769 conformément à la réglementation européenne (Directive 2010/63/EU).

### **Animaux**

Les souris transgéniques surexprimant le mutant humain *CHMP2B*<sup>intron5</sup> sous le contrôle du promoteur Thy1.2 ont été génotypées comme décrit précédemment [10]. Les souris SOD1<sup>G86R</sup> ont été génotypées comme décrit précédemment [11]. Des souris mâles ont été utilisées pour les analyses biochimiques et des femelles ont été utilisées pour les analyses histologiques.

Les souris ont été élevées (2-5 par cage) dans l'animalerie de la faculté de médecine de Strasbourg, dans un environnement thermorégulé (22±1°C) et hygrorégulé, avec une alternance des cycles lumière/obscurité de 12h. Les souris avaient accès à l'eau et à la nourriture (croquettes A04 standards) *ad libitum*.

### **Tests comportementaux**

Les tests moteurs ont été réalisés sur des souris non transgéniques (nTg) et hétérozygotes (HE) de la lignée *CHMP2B*<sup>intron5</sup> à 3, 6, 12 et 18 mois, ainsi que sur des souris homozygotes (HO) et leurs contrôles (Ctr HO) à 3 et 6 mois. Les souris « Ctr HO » correspondent à des souris non transgéniques de poids et de taille identiques aux souris HO, mais d'âge différent. Les résultats obtenus chez les souris HO ont été comparés à ceux des groupes nTg et Ctr HO. Les altérations de la démarche ont été évaluées par le système d'analyse Catwalk de Noldus. Les souris, placées sur une plaque de verre tactile, traversent un couloir obscur et chaque empreinte de patte est enregistrée par une caméra. Le logiciel Catwalk identifie alors chacune de ces empreintes puis évalue plusieurs dizaines de paramètres. L'index de régularité évalue la coordination générale de la souris par estimation du pourcentage de pas incorrects durant l'ensemble du trajet. Cet index est le pourcentage d'empreintes appartenant à une foulée [12]. La « base de soutien » est la largeur moyenne entre les deux pattes antérieures ou les deux pattes postérieures. Le « cycle de travail » correspond au pourcentage moyen (dans une foulée) durant lequel une patte de l'animal est en contact avec la passerelle en verre. Le logiciel calcule un « cycle de travail » pour chaque patte de manière indépendante.

### **Microscopie électronique**

Après la mesure du poids et de la force musculaire par le test d'agrippement (ALG01, Bioseb France), les souris sont anesthésiées avec une solution de kétamine (80mg/kg)-xylazine (10mg/kg) administrée par voie intrapéritonéale. Les souris sont perfusées par voie intracardiaque avec la solution de fixation

suivante (paraformaldéhyde 2,5%, glutaraldéhyde 2,5%, chlorure de calcium 50mM, cacodylate sodique 0,1M, pH 7,4). Les muscle long extenseur des orteils (*extensor digitorum longus* muscle, EDL) sont ensuite prélevés et post-fixés avec la solution de fixation suivante (tampon de cacodylate 0,1M, tétroxyde d'osmium 1%) pendant 1 heure à 4°C et à l'obscurité. Les étapes suivantes ont été réalisées au centre d'imagerie de l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France). Les tissus sont ensuite déshydratés par des bains croissants et successifs d'alcool (50%, 70%, 90%, 100%) puis avec une solution d'oxyde de propylène. Les tissus sont incubés à 4°C durant 6 heures dans une solution d'oxyde de propylène et d'épon (ratio 1 :1) puis dans une solution d'épon. L'inclusion est réalisée dans une solution d'épon à 60°C durant 2 jours. Des sections de 70 nanomètres d'EDL sont obtenues à l'aide d'un ultramicrotome. Enfin, l'étape de contraste est réalisée avec des solutions d'acétate d'uranyle et de plomb avant l'observation des coupes sous un microscope électronique à transmission.

### **Histologie et immunohistochimie**

Les souris sont profondément anesthésiées avec une solution de pentobarbital sodique (120Mmg/kg) injectée par voie intrapéritonéale.

Pour les expériences d'immunofluorescence, les souris sont perfusées par voie intracardiaque avec une solution de paraformaldéhyde à 4%, pH 7,4. Les muscles sont post-fixés dans une solution identique toute la nuit puis placés à 4°C dans un tampon phosphate salin (PBS) contenant 0,02% de thimérosal jusqu'à utilisation. Les muscles sont pesés et les fibres d'EDL sont ensuite séparées sous loupe binoculaire. Les fibres sont pré-traitées 30 minutes dans une solution de saturation contenant 0,3% de triton X-100, 8% de sérum de cheval et 0,3% de sérum albumine bovin. Les fibres sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C en présence d'anticorps dirigés contre la synaptophysine (développé par Eurogentec chez le lapin à partir du peptide suivant : H-CAP PGA PEK QPA PGDA-NH<sub>2</sub>, 1/50). Après trois lavages au PBS, les fibres sont incubées deux heures en présence de l'anticorps secondaire (immunoglobulines d'âne-anti-IgG de lapin couplées à l'Alexa 488, Jackson immunoresearch, 1/1000) et de l'alpha-bungarotoxine conjuguée à la rhodamine ( $\alpha$ BGT 1 $\mu$ g/ $\mu$ L Sigma, 1/1000). Les noyaux sont marqués avec du Hoeschst 33342 (1  $\mu$ g/ml; Sigma). Les fibres sont ensuite montées en milieu aqueux dans l'aquapoly mount (18606, Polysciences) sur des lames superfrost. Enfin, les images sont acquises séquentiellement sur un microscope confocal (confocal Leica SP5 Leica Microsystems CMS GmbH) équipé d'un objectif 63X à huile (NA 1.4). Les longueurs d'ondes d'excitation sont les suivantes : diode 405nm, argon 488nm, diode 561 nm. Les longueurs d'ondes d'émission sont 410-450nm pour le Hoeschst 33342, 500-540nm pour l'Alexa488, 570-630nm pour la rhodamine.

Pour les marquages enzymatiques, des échantillons de TA non fixés sont inclus dans de l'OCT et congelés immédiatement dans l'isopentane à -40°C. Des coupes de 14 $\mu$ m sont réalisées au cryostat. Les coupes sont fixées dans une solution d'acétone 15 minutes à 4°C puis séchées 30 minutes à l'air.



Pour le marquage de la succinate déshydrogénase (SDH), les coupes sont placées 2 heures à 37°C dans une solution composée de 1% de succinate de sodium dibasique, 0,2% de nitrobleu de tétrazolium complété avec 0,0025% de phénazine méthosulphate. Les coupes sont rincées à l'eau puis montées avec du milieu aquapolymount.

Pour le marquage de la cytochrome oxydase (COX), les coupes sont placées 1 heure à température ambiante avec une solution contenant 0,1% de cytochrome C, 7,5% de sucrose, 0,004% de catalase et 0,05% de 3,3'-diaminobenzidine. Les coupes sont rincées à l'eau puis déshydratées dans des bains croissants d'alcool suivi d'une déshydratation finale au xylène. Enfin, les coupes sont montées dans l'histokit.

Le comptage des fibres musculaires est réalisé manuellement à l'aide du logiciel imageJ sur la totalité des fibres de 2 coupes de TA par animal. Pour le marquage COX, nous avons respectivement utilisé 3 et 6 souris non transgéniques à 12 et 24 mois et 6 et 8 souris HE à 12 et 24 mois. Pour le marquage SDH, entre 6 et 7 animaux ont été utilisés par génotype et par âge.

### **Analyses électrophysiologiques**

Les souris sont anesthésiées avec une solution de kétamine (80mg/kg)-xylazine (10mg/kg) injectée par voie intrapéritonéale et placées sur un tapis chauffant durant toute l'expérience. L'activité électrique spontanée du muscle gastrocnémien est évaluée par électromyogramme (EMG). La vitesse de conduction nerveuse est ensuite mesurée au niveau de la queue des souris. Enfin, un test de stimulation nerveuse répétée (SNR) est réalisé au niveau du nerf sciatique. 10 stimulations successives sont effectuées à 4 fréquences différentes : 3, 10, 20 et 50 Hz. Pour chaque fréquence, 3 trains de 10 stimulations sont réalisées avec 15 secondes de repos entre chaque train. Avant chaque changement de fréquence, 2 minutes et demie de repos sont laissées à la souris. Pour chaque fréquence, deux pourcentages de décrétement sont calculés avec l'équation suivante :

$$\% \text{ de décrétement} = \left( \frac{\text{Amplitude de la première stimulation} - \text{Amplitude de la Xième stimulation}}{\text{Amplitude de la première stimulation}} \right) \times 100$$

Ce pourcentage a été calculé à la 5<sup>e</sup> stimulation et à la 10<sup>e</sup> stimulation.

### **Analyses biochimiques**

Les souris anesthésiées sont mises à mort par décapitation et les tissus sont collectés et aussitôt placés à -80°C jusqu'à utilisation.

### **Extraction d'ARN et PCR en temps réel**

L'ARN total est extrait selon le protocole suivant. Chaque échantillon congelé est placé dans un tube contenant une bille de métal de 5mm de diamètre. Sur glace, 1mL de trizol (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) est ajouté et l'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un tissuelyser (Qiagen) pendant 3 minutes à une fréquence de 30Hz. L'ARN est extrait par une technique de chloroforme/isopropanol/éthanol et stocké à -80°C jusqu'à son utilisation. Un microgramme d'ARN

total est utilisé pour synthétiser l'ADNc en utilisant la transcriptase inverse Iscript (iscript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, Bio-Rad) comme spécifié par le fournisseur. L'expression génique est ensuite mesurée par l'utilisation de SYBR green (SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad) selon les instructions du fournisseur sur un thermocycleur. La PCR est réalisée dans les conditions suivantes : dénaturation de 30 secondes à 95 °C suivie par 40 cycles de 4 secondes à 95 °C et 4 secondes à 60 °C. Les séquences des amorces utilisées sont disponibles dans la table S1 du matériel supplémentaire. La standardisation est réalisée en utilisant 3 gènes standards : *H1h2bc*, *H2ac* et *Tbp* et le logiciel Genorm v3.5.

### **Analyses statistiques**

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  erreur standard. Le logiciel GraphPad Prism (version 6.0a) est utilisé pour les analyses statistiques. Les tests utilisés sont indiqués dans la légende de chaque figure. Les données avec une valeur *p* inférieure à 0,05 sont considérées comme significatives.

## **Résultats**

### ***L'expression neuronale du mutant CHMP2B<sup>intron5</sup> est suffisante pour déclencher des altérations de la démarche et de la coordination motrice.***

Les capacités motrices des souris transgéniques et non transgéniques ont été évaluées en utilisant l'appareil catwalk. Les souris HE et HO présentent une altération de la coordination similaire avec une diminution de l'index de régularité à partir de 6 mois chez les HO et à partir de 18 mois chez les HE (Fig 1A). De plus, l'écartement des pattes postérieures est plus important chez les souris transgéniques que chez les souris nTg. Il augmente de 20% à 3 mois et de 37% à 6 mois chez les souris HO en comparaison à l'écartement des pattes postérieures des souris Ctr HO. Chez les souris HE, cet écartement est significativement plus important à celui des souris nTg à 6 mois (augmentation de 8,5%), 12 mois (augmentation de 14%) et 18 mois (augmentation de 20%) (Fig 1B). Nous avons ensuite évalué le « cycle de travail » qui correspond au pourcentage de temps moyen (dans une foulée) durant lequel une patte de l'animal est en contact avec la passerelle en verre. Ce pourcentage augmente chez les souris HO à partir de 6 mois et chez les souris HE à partir de 18 mois en comparaison des souris nTg et Ctr HO (Fig 1C-D). Les souris HO présentent également une augmentation de l'intensité avec laquelle elles posent les pattes postérieures et une tendance à la diminution de cette intensité au niveau des pattes antérieures à 6 mois par rapport aux souris Ctr HO (Fig 1E). A 18 mois, cette intensité est plus faible chez les souris HE que chez les souris nTg au niveau des pattes postérieures (Fig 1F).

***L'expression de CHMP2<sup>intron5</sup> entraîne une altération structurale et fonctionnelle de la jonction neuromusculaire.***

Après avoir mis en évidence ces altérations motrices, nous nous sommes intéressés à l'ultrastructure de la JNM au niveau des muscles des membres postérieurs. A 18 mois, les souris HE présentent une diminution de leur masse corporelle et de leur force musculaire par rapport aux souris nTg de même âge (Fig S1). Par microscopie électronique, nous avons observé au niveau de l'EDL de souris HE de 18 mois une déstructuration de la JNM, avec une forte réduction des invaginations post-synaptiques ainsi qu'une accumulation de structures denses aux électrons au niveau pré-synaptique (Fig 2A). De plus, des marquages avec un anticorps dirigé contre la synaptophysine ont mis en évidence chez les souris HE une distribution anormale des vésicules synaptiques au niveau de la terminaison pré-synaptique de la JNM. Chez les souris HE, les vésicules semblent se regrouper sous forme de clusters alors que chez les souris nTg, elles sont réparties de manière homogène (Fig 2B).

Pour évaluer la fonctionnalité de la JNM, nous avons réalisé différents tests électrophysiologiques. Les EMG réalisés à 24 mois montrent chez les souris HE la présence d'une légère activité spontanée dans le muscle gastrocnémien (données non montrées) qui n'est pas détectée chez les souris contrôle de même âge. Les tests de mesure de vitesse de la conduction nerveuse sensitive au niveau de la queue n'ont en revanche montré aucune altération de ce paramètre à 6, 12 ou 24 mois chez les souris HE et HO (Fig 3A). Enfin, nous avons évalué la fonctionnalité de la JNM *via* le test de stimulations nerveuses répétées (SNR). Les résultats montrent une diminution progressive de l'amplitude de la réponse enregistrée (c'est-à-dire une augmentation du pourcentage de décrémentation) chez les souris HO à 6 mois pour des fréquences de 20 et 50Hz en comparaison aux souris nTg (Fig 3C, D). Le même phénomène est observé à 12 mois chez les souris HE à 50Hz avec un pourcentage de décrémentation de 20% (Fig 3C, E). A 24 mois, cette altération est également visible à des fréquences plus faibles (10 et 20Hz avec des décréments d'environ 15% et 25%) (Fig 3C). En revanche, quel que soit l'âge ou le génotype étudié, aucun décrémentation n'a été mis en évidence à une fréquence de 3Hz (Fig 3C). De plus, l'amplitude du potentiel d'action moteur composé (*Compound Muscle Action Potential*, CMAP) obtenu lors d'une stimulation unique supramaximale n'est pas différente entre les souris transgéniques et nTg aux différents âges étudiés (Fig 3B).

Nous avons réalisé les mêmes études électrophysiologiques sur le modèle SOD1<sup>G86R</sup>, un autre modèle de SLA. Ces analyses ont été réalisées à 105 jours, stade terminal de la pathologie correspondant aux souris HE de 24 mois. Les enregistrements EMG ont permis de mettre en évidence une activité électrique spontanée beaucoup plus importante que celle observée chez les souris CHMP2B<sup>intron5</sup> (données non montrées). Comme dans la lignée CHMP2B<sup>intron5</sup>, aucune variation de la vitesse de conduction nerveuse sensitive n'a été observée (Fig 4A). Cependant, les tests de SNR ont montré des résultats différents par rapport au modèle CHMP2B<sup>intron5</sup>. Premièrement, les souris SOD1<sup>G86R</sup> ne

présentent pas de décrétement à 3, 10 ou 20Hz (Fig 4C). De plus, le décrétement obtenu à 50Hz reflète l'importante dénervation du muscle, produisant des amplitudes de réponse très hétérogènes et anarchiques lors des SNR (Fig 4C, D). Enfin, contrairement à la lignée CHMP2B<sup>intron5</sup>, les souris SOD1<sup>G86R</sup> présentent une amplitude de CMAP 7 fois plus faible que celle des souris nTg (Fig 4B).

***L'expression neuronale de CHMP2B<sup>intron5</sup> entraîne une altération du métabolisme musculaire et une atrophie des muscles des membres.***

Nous nous sommes ensuite demandés si l'expression neuronale de CHMP2B<sup>intron5</sup> affectait le métabolisme du muscle. Nous avons en premier lieu pesé 3 muscles des membres postérieurs : TA, gastrocnémien et soléaire à 6, 12 et 24 mois chez des souris nTg, HE et HO. A 6 mois chez les souris HO, les poids du TA (Fig 5A), du muscle gastrocnémien (Fig 5B) et du muscle soléaire (Fig 5C) sont plus faibles que ceux des muscles des souris nTg. A 12 mois, le poids de ces muscles est identique entre les souris HE et nTg. En revanche, à 18 mois, on observe une diminution de 40% du poids du TA (Fig 5A), de 30% du poids muscle gastrocnémien (Fig 5B) et de 40% du poids du muscle soléaire (Fig 5C) chez les souris HE par rapport aux souris nTg. La comparaison du poids des muscles au cours du temps chez les souris HE montre une diminution d'entre 20% et 30% de chacun d'eux entre 6 mois et 18 mois. (Fig 5D-F).

Par révélation histochimique des activités enzymatiques des enzymes COX et SDH, deux enzymes impliquées dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, nous avons ensuite étudié la proportion de fibres glycolytiques et oxydatives au sein du TA de souris HE et nTg (Fig 6A). A 12 et 24 mois, le TA des souris HE présente des proportions de fibres glycolytiques et oxydatives similaires à celles des souris nTg (Fig 6B). Enfin, nous avons quantifié l'expression de myosines associées au métabolisme oxydatif ou glycolytique par RT-qPCR au niveau du TA. A 6 mois, les expressions de *Myh1* et de *Myh4* sont environ deux fois plus importantes chez les souris HE que chez les souris nTg (Fig 6C, E). Cependant, l'induction de *Myh1* disparaît à 12 et 24 mois (Fig 4C). Les résultats ont également montré chez les souris HE une induction de l'expression des myosines 7, 4 et 2 (Fig 6D-F) qui sont respectivement associées au métabolisme musculaire oxydatif, glycolytique et mixte. Les expressions de *Myh2* et *Myh7* en particulier sont environ 4 fois plus fortes à 24 mois chez les souris HE que chez les souris nTg. Dans le modèle SOD1<sup>G86R</sup>, des résultats similaires ont été obtenus, avec une forte induction de *Myh7* (environ 8 fois) et une tendance à l'augmentation de *Myh2* (p=0,051) au stade terminal de la pathologie (105 jours) (Fig S2).

## Discussion

Le neurone, et plus particulièrement le motoneurone, joue un rôle important dans la SLA. L'étude menée par Boilée et al a en effet montré que l'inactivation du mutant SOD1<sup>G37R</sup> spécifiquement dans les motoneurons permettait un retard de l'apparition des symptômes moteurs chez la souris, retard associé à une augmentation de la survie [13]. Les modèles murins CHMP2B<sup>intron5</sup> actuels corroborent cet impact très fort du neurone puisque les souris CHMP2B<sup>intron5</sup> (dans lesquelles l'expression du mutant est strictement ou majoritairement neuronale) présentent une diminution de la force musculaire, de l'endurance [9] ainsi qu'une paralysie progressive [10]. Notre étude appuie davantage l'impact fort du motoneurone en mettant en évidence pour la première fois des altérations directes au niveau musculaire en réponse à l'expression neuronale de CHMP2B<sup>intron5</sup>. Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'expression strictement neuronale de CHMP2B<sup>intron5</sup> entraîne une altération de la posture et de la coordination ainsi qu'une faiblesse musculaire chez les souris. Ces altérations s'accompagnent d'une déstructuration de la JNM et d'une atrophie des muscles des membres postérieurs.

L'étude de la JNM par microscopie électronique chez les souris CHMP2B<sup>intron5</sup> a tout d'abord révélé une altération structurale de la partie post-synaptique avec une perte des invaginations post-synaptiques de la JNM. De plus, le marquage des vésicules synaptiques a mis en évidence une distribution hétérogène de ces dernières chez les souris transgéniques. Enfin, les analyses par SNR ont mis en lumière une perturbation fonctionnelle de la JNM. Le fort décrétement présent à 20 et 50Hz lors des SNR indique une diminution du couplage entre le neurotransmetteur et son récepteur. Si ce décrétement n'est pas visible à 3Hz, cela est vraisemblablement dû au stock de réserve de vésicules qui prend le relais avant la dépression trop importante du nombre de vésicules synaptiques. Etant mis à disposition au bout d'une à deux secondes après la libération du premier potentiel d'action, ce stock n'est pas disponible lors des 10 stimulations à 20 ou 50Hz. Cette notion d'épuisement du stock de vésicules synaptiques serait cohérente avec leur distribution en clusters au niveau présynaptique. De plus, on pourrait penser que l'altération structurale au niveau post-synaptique limite la fixation des neurotransmetteurs sur leurs récepteurs, entraînant une diminution progressive de l'amplitude du signal. Ce type d'altération de la JNM est proche de celui observé dans la Myasthénie de Gravis (MG), une maladie auto-immune dans laquelle la fixation d'anticorps au niveau des récepteurs à l'acétylcholine limite la contraction musculaire [14, 15]. Les résultats de décrétement obtenus dans notre étude sont relativement hétérogènes, à l'instar de ceux obtenus chez les patients atteints de SLA [16-18]. Dans ces études, une partie des patients présentaient un tracé en forme de U caractéristique de la MG alors que d'autres présentaient un décrétement similaire à celui des souris CHMP2B<sup>intron5</sup> (diminution progressive). Enfin, comme chez certains patients atteints de SLA, certaines souris transgéniques présentant des troubles moteurs ne présentent pas de décrétement lors de l'enregistrement

des stimulations répétées. Toutefois, il est à noter que les résultats chez les patients ont été obtenus à des fréquences faibles (3Hz) et sur d'autres muscles (deltoïde, biceps, diaphragme).

Dans notre modèle, l'expression du mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> au niveau neuronal est suffisante au développement de la plupart des caractéristiques de la SLA, proposant un rôle très fort du neurone dans le développement et la propagation des altérations liées à la SLA. Cependant, certaines altérations sont absentes de notre modèle, notamment l'augmentation de la proportion de fibres musculaires oxydatives ou encore la mort des motoneurones [10, 19]. De plus, les analyses de SNR montrent des résultats différents entre les modèles *CHMP2B*<sup>intron5</sup> et *SOD1*<sup>G86R</sup>. Les résultats du modèle *SOD1*<sup>G86R</sup> indiquent une importante dénervation du muscle entraînant des réponses de stimulations nerveuses très hétérogènes les unes des autres alors que ceux du modèle *CHMP2B*<sup>intron5</sup> montrent une dénervation plus légère du muscle mais une diminution progressive du couplage entre les neurotransmetteurs et leurs récepteurs pouvant être lié à un épuisement du stock de vésicules synaptiques.

Ces résultats soulèvent l'hypothèse d'une toxicité non neuronale du mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> pouvant être d'origine musculaire et/ou gliale. En effet, Wong et Martin ont montré que l'expression du mutant *SOD1*<sup>G37R</sup> au niveau musculaire conduisait à une dénervation et à la mort des motoneurones [20] et, dans un modèle *SOD1* similaire, Drobrowolny et al ont mis en évidence une atrophie musculaire et une diminution des performances musculaires chez les souris transgéniques [21]. Par ailleurs, la glie semble jouer un rôle dans le développement de la SLA puisque l'excision du mutant *SOD1* spécifiquement dans les astrocytes permet de retarder l'apparition des symptômes [22] et que l'implantation d'astrocytes de patients atteints de la SLA au niveau de la moelle épinière de souris non transgéniques entraîne l'atrophie des motoneurones [23]. Néanmoins, Skibinski et al ont montré par hybridation *in situ* sur un cerveau de souris, l'absence d'expression de *CHMP2B* dans les cellules gliales. Au niveau du muscle squelettique, ils n'ont mis en évidence sa présence qu'au niveau de l'ARNm [24]. Au niveau protéique, la présence de *CHMP2B* dans le muscle a été mise en évidence à deux reprises, une fois par immunofluorescence au niveau du muscle cardiaque [25] et une seconde fois par western blot au niveau du muscle squelettique [10]. Cependant, la quantité de protéine *CHMP2B* dans le muscle squelettique apparaît faible en comparaison de celle mesurée dans le système nerveux central. Ainsi, comme dans les modèles *SOD1*, il est possible que la toxicité de *CHMP2B*<sup>intron5</sup> ne soit pas uniquement neuronale mais également musculaire, participant ainsi à la dégénérescence des motoneurones [26]. Néanmoins, contrairement aux mutants *SOD1* ou *FUS* qui sont fortement exprimés dans le muscle squelettique [27, 28], il est probable que le mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> ait un impact moins important sur le muscle du fait de sa faible traduction.

Si l'on ignore encore qui du muscle ou du motoneurone initie le premier des deux une influence pathologique sur le second, plusieurs modèles dont le nôtre, tendent à prouver que les atteintes les plus précoces concernent la JNM qui dégénère avant la mort du motoneurone, l'apparition des symptômes moteurs ou l'atrophie musculaire [10, 29]. Ces altérations de la JNM sont retrouvées dans d'autres maladies du motoneurone comme l'Amyotrophie Spinale [30] ou des dystrophies musculaires comme la myopathie de Duchenne [31, 32]. L'axone apparait donc comme la partie la plus vulnérable du motoneurone dans la SLA, dégénéralant avant le soma comme le propose l'hypothèse de « dying-back ».

## **Références**

1. Turner, M.R., et al., Genetic screening in sporadic ALS and FTD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2017. 88(12): p. 1042-1044.
2. El Oussini, H., et al., Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 2017. 82(3): p. 444-456.
3. Philips, T. and J.D. Rothstein, Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*, 2014. 262 Pt B: p. 111-20.
4. Loeffler, J.P., et al., The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathol*, 2016. 26(2): p. 227-36.
5. Turner, B.J., E.C. Lopes, and S.S. Cheema, Neuromuscular accumulation of mutant superoxide dismutase 1 aggregates in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 2003. 350(2): p. 132-6.
6. Halter, B., et al., Oxidative stress in skeletal muscle stimulates early expression of Rad in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*, 2010. 48(7): p. 915-23.
7. Siciliano, G., et al., Impaired oxidative metabolism in exercising muscle from ALS patients. *J Neurol Sci*, 2001. 191(1-2): p. 61-5.
8. Vielhaber, S., et al., Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 1999. 169(1-2): p. 133-9.
9. Clayton, E.L., et al., Early microgliosis precedes neuronal loss and behavioural impairment in mice with a frontotemporal dementia-causing CHMP2B mutation. *Hum Mol Genet*, 2017. 26(5): p. 873-887.
10. Vernay, A., et al., A transgenic mouse expressing CHMP2Bintron5 mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet*, 2016. 25(15): p. 3341-3360.
11. Ripps, M.E., et al., Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(3): p. 689-93.
12. Hamers, F.P., G.C. Koopmans, and E.A. Joosten, CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 2006. 23(3-4): p. 537-48.

13. Boillee, S., et al., Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, 2006. 312(5778): p. 1389-92.
14. Meriggioli, M.N. and D.B. Sanders, Myasthenia gravis: diagnosis. *Semin Neurol*, 2004. 24(1): p. 31-9.
15. Gilchrist, J.M. and D.B. Sanders, Myasthenic U-shaped decrement in multifocal cervical radiculopathy. *Muscle Nerve*, 1989. 12(1): p. 64-6.
16. Sun, X.S., et al., Repetitive Nerve Stimulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Chin Med J (Engl)*, 2018. 131(18): p. 2146-2151.
17. Hatanaka, Y., et al., Utility of repetitive nerve stimulation test for ALS diagnosis. *Clin Neurophysiol*, 2017. 128(5): p. 823-829.
18. Killian, J.M., et al., Decremental motor responses to repetitive nerve stimulation in ALS. *Muscle Nerve*, 1994. 17(7): p. 747-54.
19. Palamiuc, L., et al., 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*, 2015. 7(5): p. 526-46.
20. Wong, M. and L.J. Martin, Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet*, 2010. 19(11): p. 2284-302.
21. Dobrowolny, G., et al., Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab*, 2008. 8(5): p. 425-36.
22. Pramatarova, A., et al., Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci*, 2001. 21(10): p. 3369-74.
23. Qian, K., et al., Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports*, 2017. 8(4): p. 843-855.
24. Skibinski, G., et al., Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet*, 2005. 37(8): p. 806-8.
25. Zaglia, T., et al., Atrogin-1 deficiency promotes cardiomyopathy and premature death via impaired autophagy. *J Clin Invest*, 2014. 124(6): p. 2410-24.
26. Dupuis, L., et al., Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One*, 2009. 4(4): p. e5390.
27. Scekcic-Zahirovic, J., et al., Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J*, 2016. 35(10): p. 1077-97.
28. Dobrowolny, G., M. Aucello, and A. Musaro, Muscle atrophy induced by SOD1G93A expression does not involve the activation of caspase in the absence of denervation. *Skelet Muscle*, 2011. 1(1): p. 3.
29. Fischer, L.R., et al., Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol*, 2004. 185(2): p. 232-40.
30. Boido, M. and A. Vercelli, Neuromuscular Junctions as Key Contributors and Therapeutic Targets in Spinal Muscular Atrophy. *Front Neuroanat*, 2016. 10: p. 6.



31. Pratt, S.J.P., et al., Pre- and postsynaptic changes in the neuromuscular junction in dystrophic mice. *Front Physiol*, 2015. 6: p. 252.
32. van der Pijl, E.M., et al., Characterization of neuromuscular synapse function abnormalities in multiple Duchenne muscular dystrophy mouse models. *Eur J Neurosci*, 2016. 43(12): p. 1623

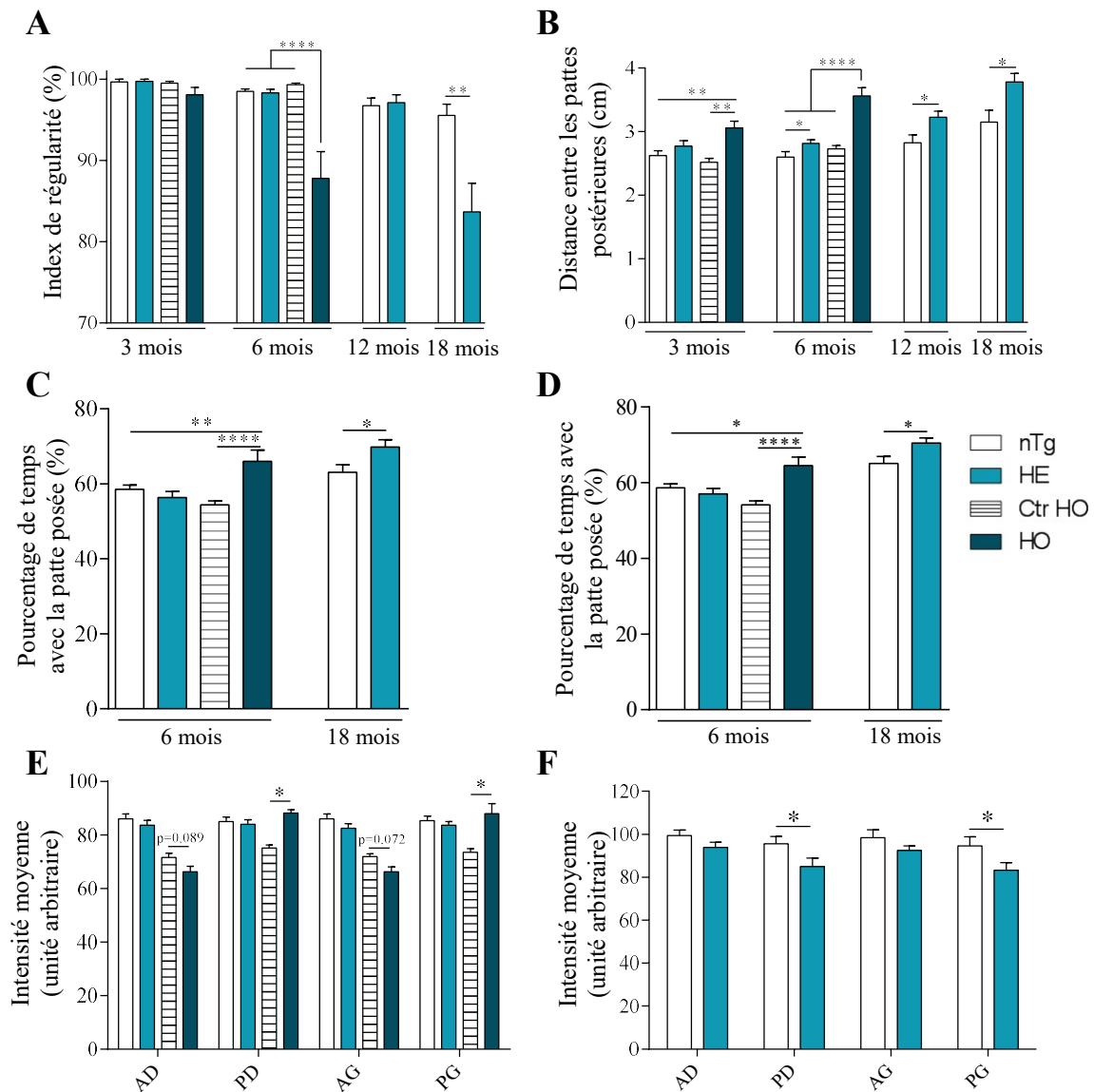


Figure 1: Les souris  $CHMP2B^{intron5}$  développent progressivement des altérations de la coordination motrice et de la posture.

A. Diminution de l'index de régularité à 6 mois chez les souris HO et à 18 mois chez les souris HE.

B. Augmentation progressive de l'écartement des pattes postérieures à partir de 3 mois chez les souris HO et de 6 mois chez les souris HE.

C-D. Augmentation de la proportion de temps passé avec les pattes antérieures gauche (C) et droite (D) posées à 6 mois chez les souris HO et à 18 mois chez les souris HE.

E-F. Intensité moyenne avec laquelle chaque patte est posée à 6 (E) et 18 mois (F).

Les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  erreur standard. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ANOVA à une voie (A-D) ou à deux voies (E, F) suivies d'un test de Fischer ou test t (A-D). nTg:  $n = 14/15/16/9$ ; HE:  $n = 16/16/16/8$ . Ctr HO:  $n = 10/19$ ; HO:  $n = 5/7$ . nTg: souris non transgénique, HE: souris hétérozygote, HO: souris homozygote, Ctr HO: souris non transgénique de poids et taille identiques aux souris HO. AD: patte antérieure droite; PD: patte postérieure droite; AG: patte antérieure gauche; PG: patte postérieure gauche.

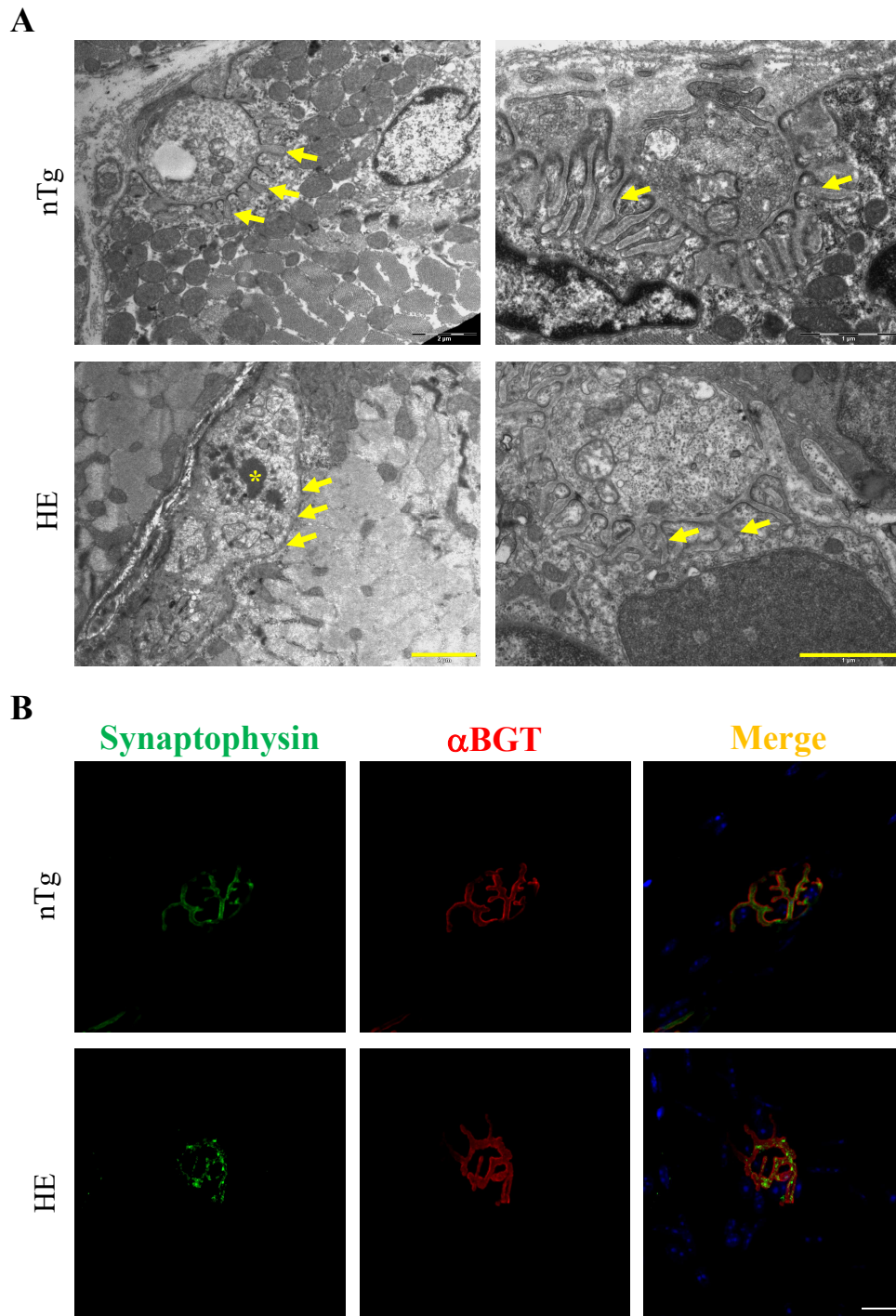


Figure 2: Le mutant CHMP2B<sup>intron5</sup> entraîne une altération structurale de la jonction neuromusculaire. A. Les souris heterozygotes (HE) présentent une diminution modérée (gauche) ou importante (droite) des invaginations post-synaptiques de la jonction neuromusculaire (flèches jaunes) ainsi qu'une accumulation de matériel dense aux électrons (astérisque jaune) au niveau de l'EDL à 18 mois en comparaison des souris non transgéniques (nTg). Echelle: gauche= 1 $\mu$ m; droite= 2 $\mu$ m. B. Immunomarquage des vésicules synaptiques avec un anticorps dirigé contre la synaptophysine (vert) et marquage des récepteurs de l'acétylcholine avec de l' $\alpha$ BGT couplée à la rhodamine (rouge) au niveau de la jonction neuromusculaire d'EDL à 24 mois. Chez les souris HE, les vésicules synaptiques sont regroupées sous forme de clusters en comparaison de la distribution homogène observée chez les souris nTg. Echelle: 20 $\mu$ m.  $\alpha$ BGT: alpha bungarotoxine.

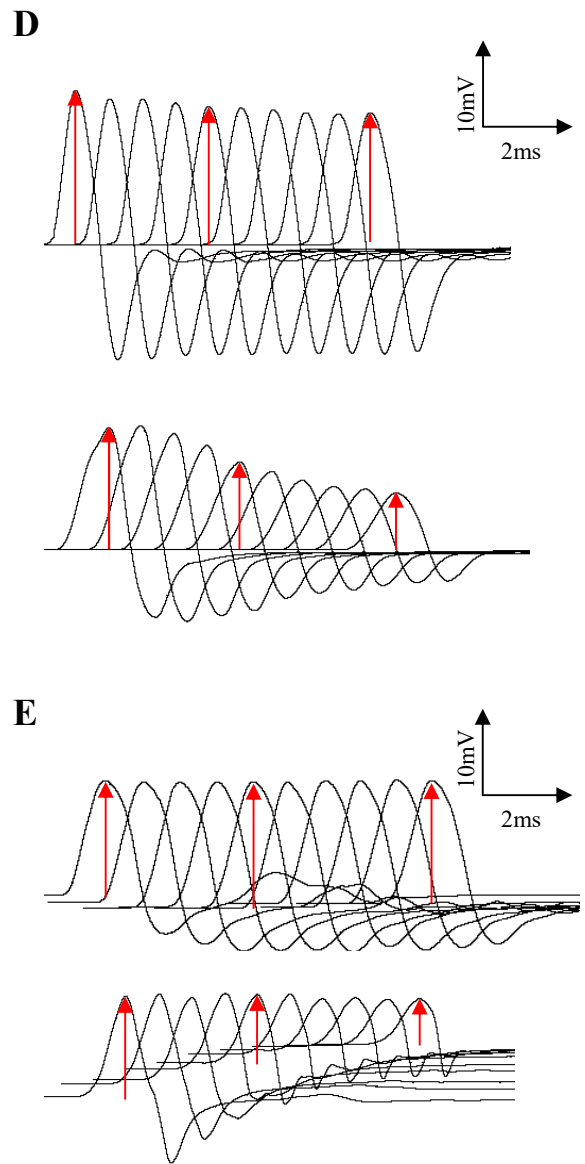
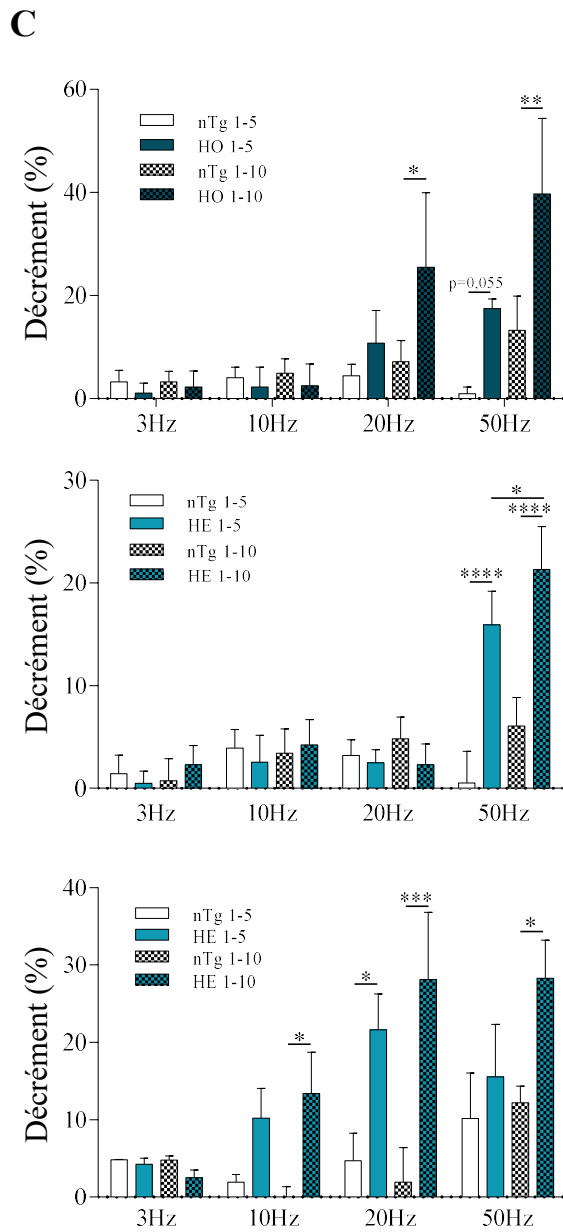
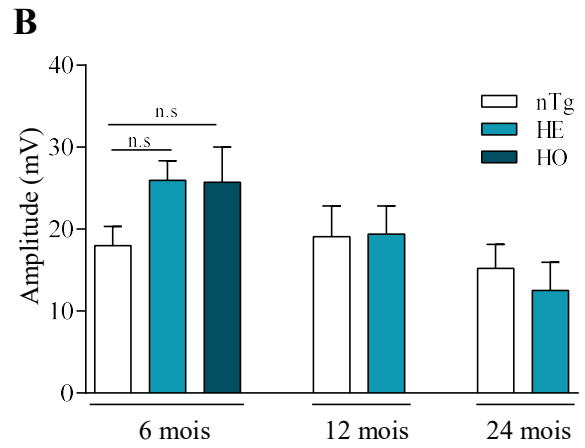
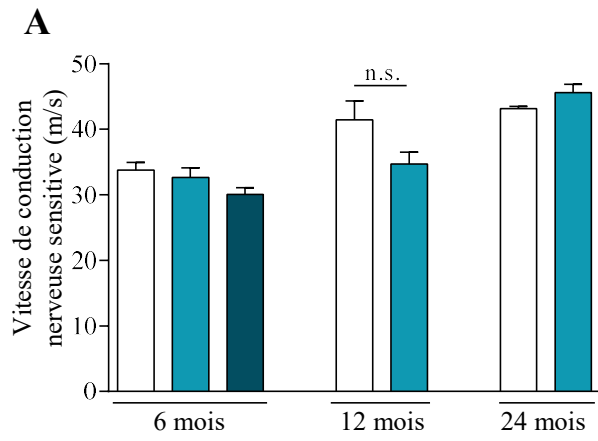


Figure 3: L'expression neuronale de *CHMPB*<sup>intron5</sup> entraîne une altération fonctionnelle de la jonction neuromusculaire.

A-B. Les souris *CHMPB*<sup>intron5</sup> ne présentent pas d'altération de la vitesse de conduction nerveuse sensitive au niveau de la queue (A) ni de l'amplitude du potentiel d'action musculaire composé (CMAP) à 6,12 ou 24 mois (B).

C. Les tests de stimulations nerveuses répétées à 6 (haut), 12 (milieu) et 24 mois (bas) montrent une diminution progressive de l'amplitude de réponse à 20 et 50Hz chez les souris homozygotes (HO) à 6 mois (haut) et chez les souris hétérozygotes (HE) à 12 (milieu) et 24 mois (bas) à 10, 20 et 50Hz.

D-E. Tracés représentatifs des CMAP en réponse à de stimulations nerveuses répétées à 50Hz à 6 mois (D) chez les souris non transgéniques (nTg) (haut) et HO (bas) et à 24 mois (E) chez les souris nTg (haut) et HE (bas).

Les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  erreur standard. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ANOVA à une voie (A-B) ou à deux voies (C) suivies d'un test de Fischer ou test t (F-G). n=4-6 par groupe.

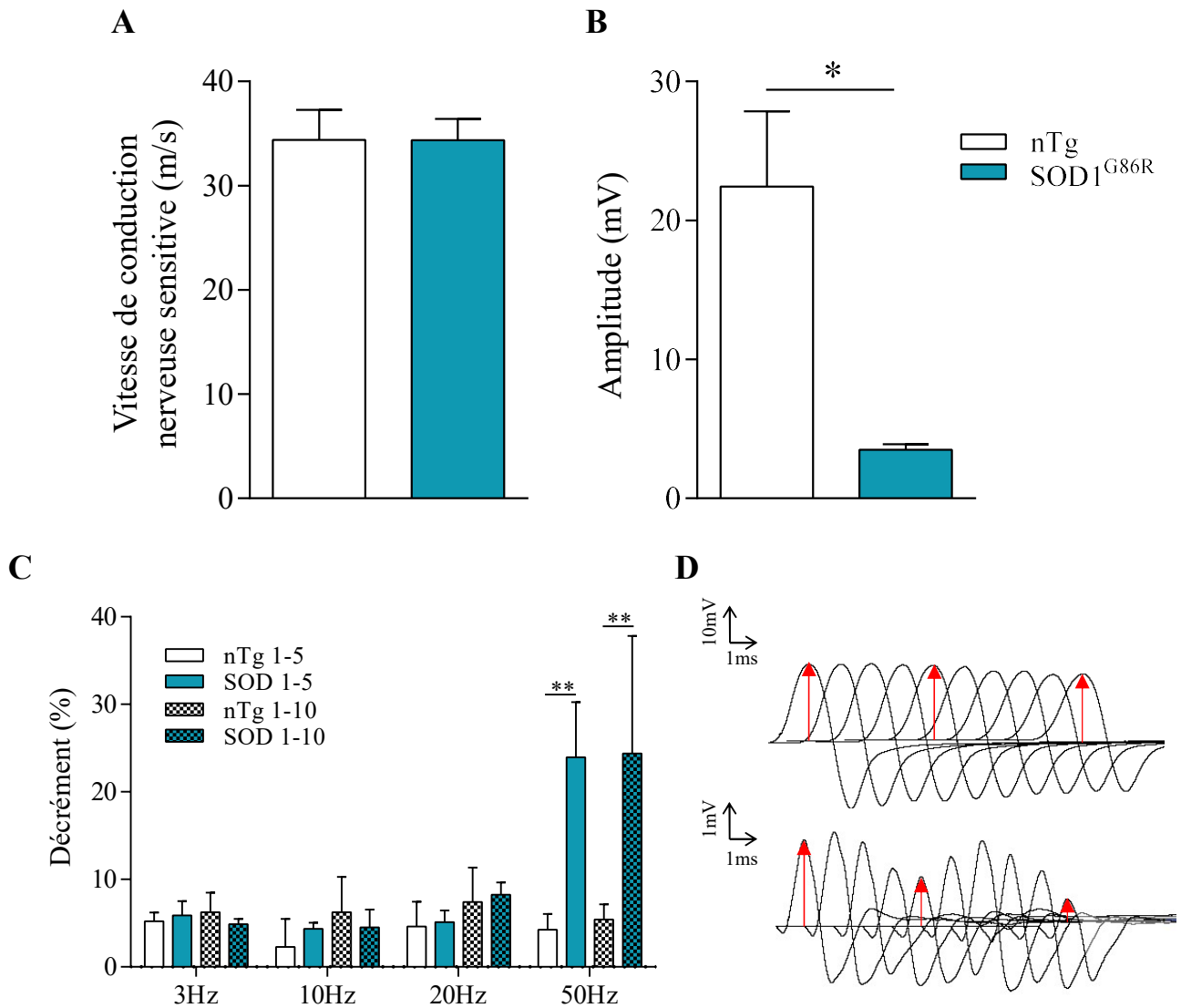


Figure 4: Les souris SOD1<sup>G86R</sup> présentent des altérations de la JNM différentes de celle des souris CHMPB<sup>intron5</sup>.

A. Les souris SOD1<sup>G86R</sup> présentent des vitesses de conduction nerveuse sensitive au niveau de la queue similaires à celles des souris non transgéniques (nTg) à 105 jours (stade terminal).

B. L'amplitude des CMAP à 105 jours est plus faible chez les souris SOD1<sup>G86R</sup> que chez les souris nTg.

C. Les souris SOD1<sup>G86R</sup> à 105 jours ne présentent pas de diminution progressive de l'amplitude du CMAP lors de stimulation répétées excepté à 50Hz.

D. Tracé représentatif de stimulations nerveuses répétées à 50Hz à 105 jours chez les souris nTg (haut) et SOD1<sup>G86R</sup> (bas).

Les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  erreur standard. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ANOVA à deux voies (C) suivies d'un test de Fischer ou test t (A-B).  $n=3$  par groupe.

*Tibialis* antérieur

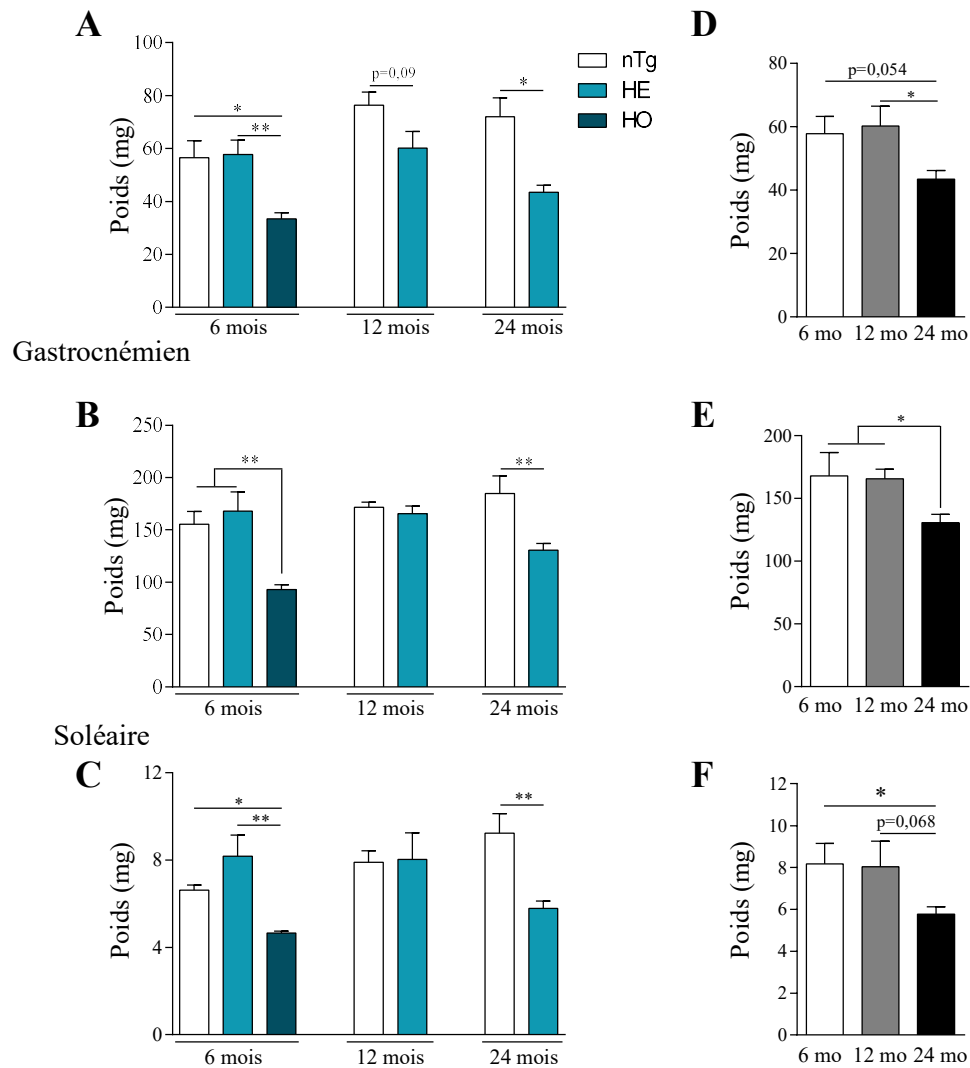


Figure 5: L'expression neuronale de *CHMP2B*<sup>intron5</sup> entraîne une atrophie progressive des muscles des membres postérieurs.

A-C. Poids des muscles *tibialis* antérieur (TA), gastrocnémien et soléaire chez des souris non transgéniques (nTg), hétérozygotes (He) et homozygotes (HO). Le poids des muscles est plus faible chez les souris HO et HE respectivement à 6 et 24 mois en comparaison aux souris nTg.

D-F. Poids des muscles TA (D), gastrocnémien (E) et soléaire (F) chez les souris HE à 6, 12 et 24 mois. Les souris HE présentent une atrophie progressive des trois muscles apparaissant entre 12 et 24 mois.

Les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  erreur standard. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ANOVA une voie suivie d'un test de Fischer ou test t. 6-12mois:  $n=4$  par groupe; 24 mois,  $n=6$  par groupe.

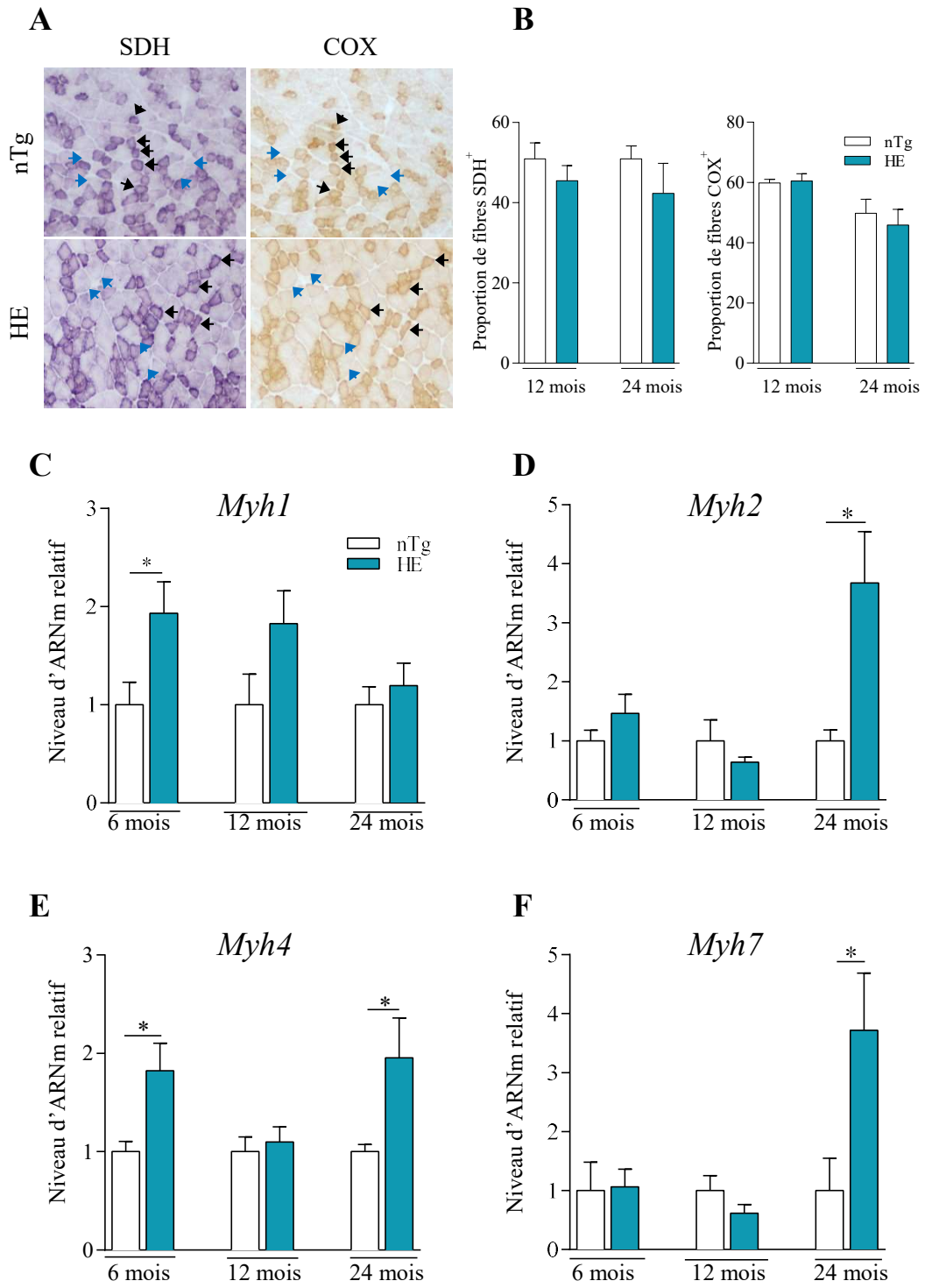




Figure 6: L'expression neuronale de *CHMP2B*<sup>intron5</sup> entraîne des modifications du métabolisme musculaire.

A. Détection de l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase (SDH; gauche) et de la cytochrome oxydase (COX; droite) visualisant les fibres oxydatives sur des coupes de TA chez des souris non transgéniques (nTg) et hétérozygotes (HE) de 24 mois. Les flèches noires montrent des exemples de fibres oxydatives et les flèches bleues indiquent des fibres glycolytiques identifiables sur les deux coupes.

B. Proportion de fibres Cox<sup>+</sup> ou SDH<sup>+</sup> par coupe de TA à 12 et 24 mois chez les souris nTg et HE.

C-F Quantification du niveau d'ARN messager de *Myh1* (I), *Myh2* (J), *Myh4* (K) et *Myh7* (L) au niveau du TA à 6, 12 et 24 mois chez des souris nTg et HE. A 6 mois, l'expression de *Myh1* et *Myh4* est induite chez les souris HE par rapport aux souris nTg ainsi que l'expression de *Myh2*, *Myh4* et *Myh7* à 24 mois.

Les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  erreur standard. \* $p < 0,05$ , test t. n=14-16 par groupe.

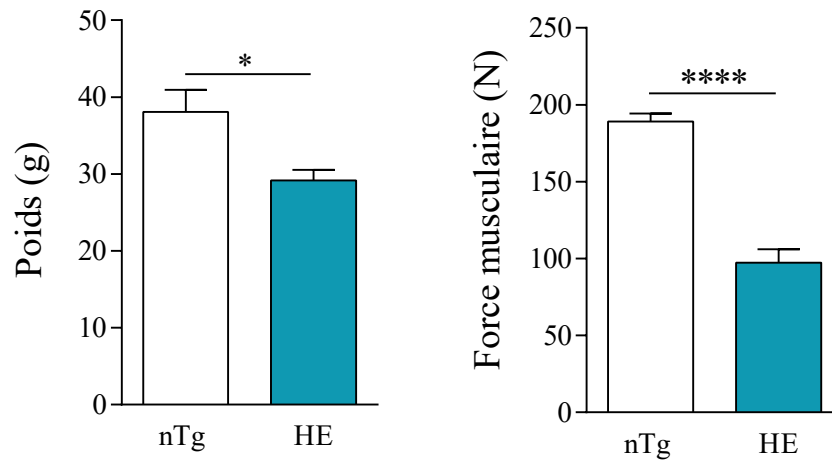


Figure supplémentaire 1: Les souris hétérozygotes (HE) présentent une diminution du poids (gauche) et de la force musculaire (droite) à 18 mois en comparaison des souris non transgéniques (nTg). Les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  erreur standard. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , test t. nTg: n=4 HE: n=6.

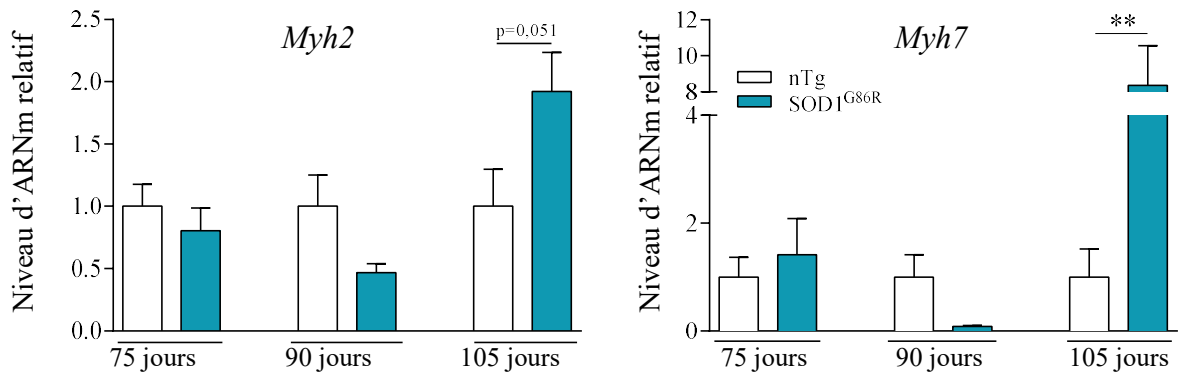


Figure supplémentaire 2: L'expression des myosines impliquées dans le métabolisme oxydatif est induite au stade avancé de la maladie chez les souris SOD1<sup>G86R</sup>. Quantification du niveau d'ARN messager de *Myh2* et *Myh7* au niveau du TA chez les souris SOD1<sup>G86R</sup> à 75, 90 et 105 jours. Les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  erreur standard. \*\*  $p < 0,01$ , test t. n=6-7 par génotype.

Gene	Forward	Reverse
<i>Myh1</i>	GCATCCCTAAAGGCAGGCTC	ACTTCCGGAGGTAAGGAGCA
<i>Myh2</i>	CGAAGCGAGGCACAAAATGT	TTGCTTGCAAAGGAACTGGG
<i>Myh4</i>	ACAGGACAGTGACAAAGAACG	GGTGAAGAGCCGAGAGGTTC
<i>Myh7</i>	CAAGAGCCGGGACATTGGT	TGTTGCAAAGGCTCCAGGTC
<i>H1h2bc</i>	GAATTCGCTACGGAGGCTTACT	AACAAGCGCTCGACCATCA
<i>H2ac</i>	GAAGTTTCCGCAGATTCTGTTGC	CAACGACGAGGAGCTCAACAAG
<i>Tbp</i>	CAGCCAAGATTCACGGTAGAT	CCAATGACTCCTATGACCCCTA

Tableau supplémentaire 1: Séquences des amorces utilisées en qPCR.

# Discussion

# Discussion

## I. CHMP2B<sup>intron5</sup> : gain ou perte de fonction ?

Encore très peu de chose sont connues au sujet de l'impact du mutant CHMP2B<sup>intron5</sup> puisque moins d'une vingtaine d'études publiées à ce jour portent sur cette mutation. Les mécanismes pathologiques liés à cette protéine partiellement tronquée pourraient être associés à la perte de fonction de CHMP2B ou au gain d'une nouvelle fonction encore inconnue.

La mutation M178V/L (conduisant à la formation du transcrit *CHMP2B<sup>intron5</sup>*) entraîne la perte des 35 derniers acides aminés de la protéine correspondant à son domaine d'interaction avec la protéine VPS4. Cette interaction permet la scission membranaire et le démantèlement du complexe ESCRT-III. Un mécanisme potentiel de perte de fonction pourrait donc être une perturbation de la formation des corps multivésiculaires, processus majeur faisant intervenir CHMP2B. Cependant, l'analyse histologique de fibroblastes de patients atteints de DFT a montré que la mutation *CHMP2B<sup>intron5</sup>* n'impacte pas la formation de vésicules intraluminales au niveau de l'endosome (Urwin et al., 2010). Néanmoins, une étude plus récente a montré dans des cultures primaires de neurones corticaux que la mutation *CHMP2B<sup>intron5</sup>* entraîne un défaut de recrutement de VPS4 pouvant être à l'origine d'altération du processus endolysosomal comme une perturbation du trafic des endosomes ou de leur fusion avec le lysosome (Clayton et al., 2018).

Cette perte partielle de CHMP2B affecte également la morphologie des neurones. En effet, l'étude de Belly et al a montré que la répression de *Chmp2b in vitro* entraîne une perturbation de la proportion des différents types d'épines dendritiques, avec une diminution de la proportion des épines dendritiques les plus larges et stables (en forme de champignon) ainsi qu'une augmentation de la proportion de celles dites fines (moins stables) (Belly et al., 2010). Dans une seconde étude, ils ont montré que la densité des épines dendritique ainsi que le nombre d'entrecroisements par neurone diminuaient lors d'une répression de *Chmp2b*. Les mêmes effets sont observés lors de l'expression d'un mutant « intron 5 » ou « Δ10 ». Mais le plus intéressant est que la protéine sauvage est capable de rétablir un développement axonal normal, même en présence de la protéine mutante (Chassefeyre et al., 2015), excluant l'hypothèse d'un effet dominant négatif de la protéine mutante.

D'un autre côté, plusieurs études ont également montré que les mécanismes pathologiques de la protéine mutante CHMP2B<sup>intron5</sup> étaient associés à un gain de fonction. Premièrement, dans le modèle que j'ai utilisé durant mon doctorat, les deux allèles du gène *Chmp2b* sont préservés tout comme leurs niveaux d'expression et de traduction. Si la perte de fonction de la protéine avait un impact important dans le développement des symptômes relatifs à la SLA et la DFT, les souris transgéniques de ce modèle ne développeraient pas de symptômes contrairement à ce qui a été démontré (Vernay et al., 2016). Cela est également valable pour les autres modèles animaux (développés par Gao et Isaacs ;

voir II.3.C.b. Modèles animaux) (Gascon et al., 2014, Ghazi-Noori et al., 2012). Enfin, l'argument le plus pertinent en faveur de l'hypothèse de gain de fonction de la protéine mutante concerne le modèle murin dans lequel le gène *Chmp2b* a été complètement éteint. Les souris transgéniques de ce modèle ne développent pas d'inclusions protéiques intra-neuronales, ne développent aucun symptôme moteur et ne présentent aucune mort prématurée (Ghazi-Noori et al., 2012).

Ainsi, l'ensemble de ces données semble montrer que, s'il existe des mécanismes pathologiques liés à la perte de fonction de CHMP2B, ils sont minimes et dispensables au développement des troubles moteurs et comportementaux liés à la SLA et la DFT.

## II. Mécanismes pathologiques associés au gain de fonction de CHMP2B<sup>intron5</sup>

Les mécanismes pathologiques du mutant CHMP2B<sup>intron5</sup> sont encore très peu compris. Pourtant certaines pistes semblent avoir été dégagées au cours des dernières années.

### 1. Agrégation de CHMP2B<sup>intron5</sup>

Pour plusieurs raisons, celle qui retient le plus l'attention est celle basée sur des troubles de l'autophagie. Tout d'abord, nous savons depuis de nombreuses années que les neurones des patients SLA et/ou DFT développent des inclusions protéiques pathologiques. Plus qu'un défaut du processus autophagique, on sait également que la protéine transgénique CHMP2B<sup>intron5</sup> forme des oligomères insolubles. Cette capacité à s'agréger pourrait provenir de la levée de son auto inhibition. Contrairement à la protéine endogène dont les extrémités N-terminale et C-terminale interagissent ensemble afin d'inactiver la protéine, la troncation de sa partie C-terminale pourrait entraîner l'agrégation du mutant (Bodon et al., 2011). Comme la protéine mutante SOD1, il semblerait que CHMP2B<sup>intron5</sup> soit capable de piéger la protéine CHMP2B endogène au niveau de ces inclusions protéiques, empêchant cette dernière de remplir ses fonctions (Chassefeyre et al., 2015).

### 2. CHMP2B<sup>intron5</sup> et maladies de stockage lysosomale

De plus, nous avons mis en évidence une perturbation de l'étape finale de l'autophagie (Figure 24). Cette accumulation d'autolysosomes est visible plusieurs mois avant l'apparition des symptômes chez les souris transgéniques, présageant d'une altération des fonctions lysosomales très précoce au sein du neurone. Cette particularité pathologique est également retrouvée chez les patients DFT porteurs d'une mutation au niveau du gène *PGRN* (progranuline) (Evers et al., 2017).

Le rôle de *PGRN* n'est pas encore complètement élucidé. Néanmoins, il est connu que la protéine se localise au sein du lysosome et qu'elle participe à l'acidification de l'organite et au métabolisme lipidique. En effet, des études de knock-out de *Pgrn* ont montré une accumulation de triglycérides dans le cerveau de souris transgéniques (Evers et al., 2017). Ainsi, dans le cas du gène *PGRN*, l'accumulation de lysosomes chez les patients est uniquement due à la perte de fonction de la protéine (Cruts and Van Broeckhoven, 2008). En revanche, CHMP2B ne présente aucune fonction connue en lien direct avec le lysosome, appuyant l'hypothèse d'un gain de fonction de la protéine mutante entraînant un blocage de l'activité lysosomale.

Ce blocage de la dégradation lysosomale pourrait être lié à une diminution de l'activité des hydrolases acides elle-même consécutive à un défaut d'acidification du lysosome. Une étude a montré que la progranuline est impliquée dans l'acidification du pH lysosomal et que sa mutation entraîne une induction de gènes codant des hydrolases ou des marqueurs du lysosome, comme ce que l'on observe



chez les souris exprimant le mutant « intron 5 » (Tanaka et al., 2017). Une seconde hypothèse serait un défaut dans l'adressage de ces hydrolases acides vers le lysosome. En effet, notre analyse transcriptomique a mis en évidence une répression importante de *Gnptab* qui code une enzyme au rôle primordiale dans l'adressage des hydrolases acides par ajout d'un groupement M6P (Voir III.1.A. Le lysosome) au niveau des enzymes lysosomales nouvellement traduites. Cette hypothèse est encore plus intéressante quand on s'intéresse à l'effet d'une répression de *GNPTAB*. En effet, la mutation des deux allèles de ce gène (entraînant une perte de fonction de la protéine) provoque la mucopolidose, une maladie développementale létale durant l'enfance (Leroy et al., 2014). Cette pathologie fait partie de la classe des maladies de stockage lysosomale qui se caractérisent par une accumulation de lysosome de taille supérieure à la moyenne. De plus, les modèles murins *Gnptab*<sup>-/-</sup> montrent des caractéristiques très similaires aux souris transgéniques de notre modèle avec une diminution de la masse pondérale, une diminution de l'endurance (test de rotarod), une altération de la posture (perturbation de la coordination, augmentation de l'écartement des pattes postérieures) et une accumulation de lysosomes dans les neurones (Paton et al., 2014). Enfin, l'induction observée dans notre étude transcriptomique des gènes codant des hydrolases acides (cathepsines D, S, Z) pourrait être la conséquence de cette répression de *Gnptab*. En effet, une étude a montré l'effet répresseur de *Gnptab* sur l'expression des hydrolases acides dans les ostéoclastes (Lei et al., 2015).

Toutefois, et contrairement à la plupart des gènes associés aux maladies de stockage lysosomale (*PGRN*, *GNPTAB*, *LAMP2*, *CTSD* ou *GALC*), la protéine CHMP2B<sup>intron5</sup> semble agir par gain de fonction rendant la compréhension de ses mécanismes pathologiques plus complexe (Endo et al., 2015, Shacka and Roth, 2007, Tappino et al., 2010).

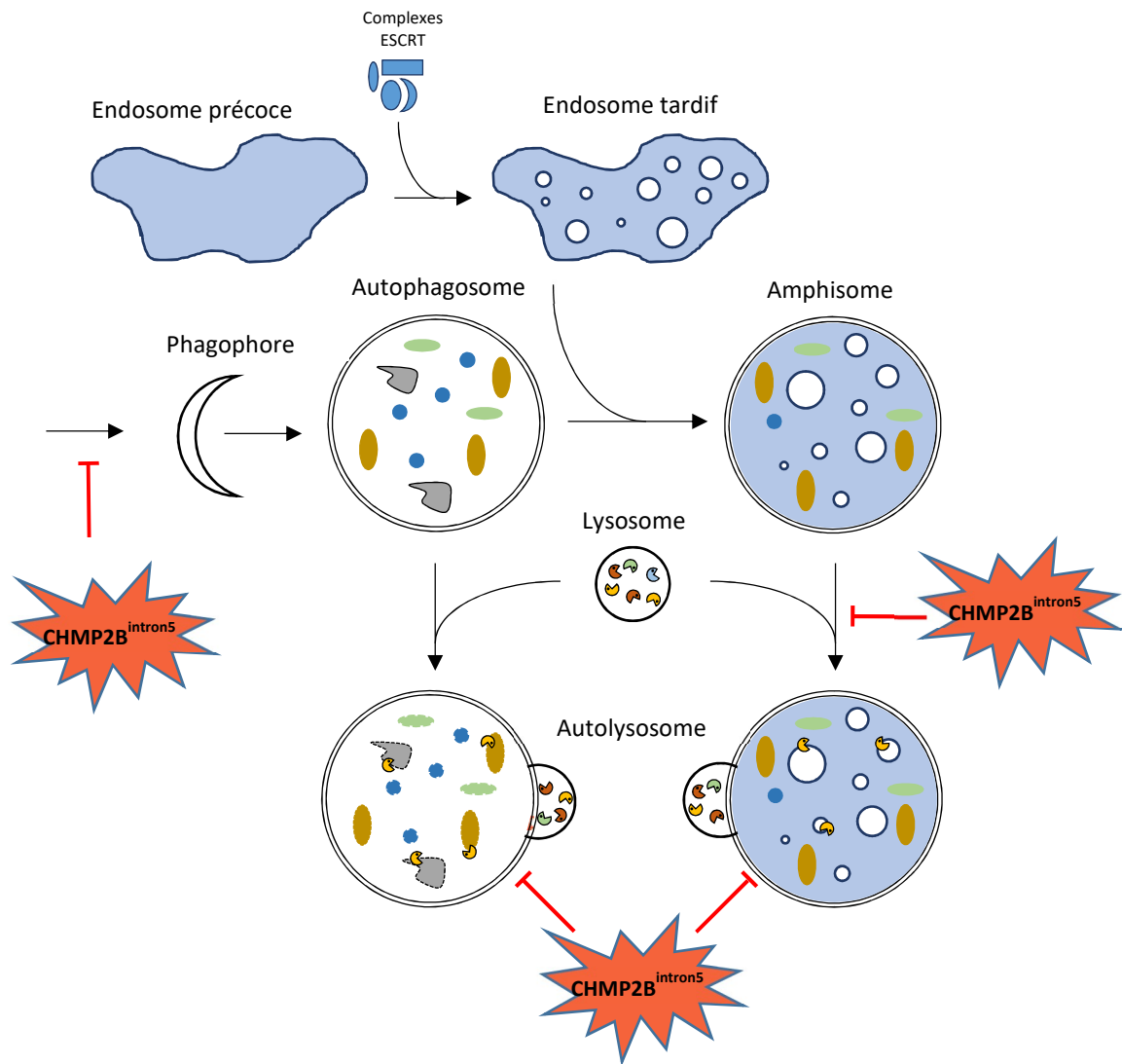


Figure 24 : Impact du mutant  $CHMP2B^{intron5}$  sur le processus autophagique

Le mutant  $CHMP2B^{intron5}$  semble impacter l'étape finale de dégradation du contenu de l'autolysosome ainsi que la fusion entre l'endosome tardif et le lysosome. Le mutant semble également entraîner une répression de l'initiation de l'autophagie. Entre revanche, la formation de corps multivésiculaires à partir de l'endosome précoce n'est pas impactée.

### 3. RAB7 et trafic endolysosomal

Associée à cette accumulation d'autolysosomes, Urwin et al ont montré que l'expression de  $CHMP2B^{intron5}$  entraînait une accumulation d'endosomes tardifs par un possible défaut de recrutement de RAB7 sur l'endosome (Urwin et al., 2010). En effet, des études ont montré que l'extinction ou la répression de RAB7 entraînait une accumulation d'endosomes tardifs (Takahashi et al., 2017, Vanlandingham and Ceresa, 2009). Le rôle de RAB7 va d'ailleurs au-delà de la simple fusion entre endosome et lysosome puisqu'il est impliqué dans le trafic des endosomes tardifs par interaction indirecte avec le complexe dynéine-dynactine (Johansson et al., 2007, Tan et al., 2011). Ce défaut de recrutement de RAB7 au niveau des endosomes en présence du mutant  $CHMP2B^{intron5}$  pourrait être lié

à son état (actif ou non). En effet, une étude récente a montré que RAB7 était plus ou moins localisé au niveau de l'endosome et du lysosome en fonction de son état (GDP/GTP) (Jimenez-Orgaz et al., 2018). Toutefois, le rôle de RAB7 semble plus complexe que cela et reste encore relativement incompris puisque Kuchitsu et al ont montré que son extinction dans des cellules Hela n'entravait pas la fusion entre endosome/autophagosome et lysosome mais bloquait la maturation de l'autolysosome (dégradation de son contenu) (Kuchitsu et al., 2018).

#### 4. *TMEM106B*, facteur de risque de la DFT

Le gène *TMEM106B* (transmembrane protein 106B) code une protéine transmembranaire localisée au niveau de l'endosome tardif et du lysosome. Sa fonction est encore mal comprise. Toutefois, Brady et al ont montré que l'induction de *Tmem106b* entraînait une diminution de la dégradation protéique (Brady et al., 2013). L'année suivante, une autre étude portant sur *TMEM106B* a montré que la protéine interagissait avec MAP6 (microtubule-associated protein 6) et contrôlait le trafic de l'endosome et du lysosome au niveau des dendrites. L'interaction de *TMEM106B* avec MAP6 entraîne un arrêt du trafic de la vésicule. Ainsi, la répression de *Tmem106b* est liée à une induction du transport rétrograde du lysosome mais aussi à une diminution du nombre de prolongements formés par le neurone (Schwenk et al., 2014).

Si de plus en plus d'études portent sur ce gène, c'est en partie dû au fait que *TMEM106B* est un facteur de risque dans les maladies neurodégénératives et en particulier dans les cas de DFT. En effet, ce gène est sujet au polymorphisme nucléotidique entraînant la modification d'une sérine en thréonine en position 185. Les neurones présentant cet haplotype semblent plus vulnérables lors du vieillissement. Une étude transcriptomique basée sur des échantillons de sujets sains porteurs de l'allèle protecteur ou l'allèle « à risque » a montré une importante dérégulation de gènes impliqués dans la signalisation synaptique au niveau du cortex temporal (Ren et al., 2018). De plus, l'atrophie du cortex chez les patients atteints de DFT apparaît comme plus ou moins marquée en fonction du polymorphisme de *TMEM106B* (Harding et al., 2017).

Il a également été montré que l'expression de *TMEM106B* est plus importante chez les patients atteints de DFT que chez les individus sains au niveau des cortex frontal, temporal et occipital. Cette induction s'accompagne, chez les patients porteurs d'une mutation dans le gène *PGRN*, d'une augmentation de la quantité protéique de *TMEM106B* (Chen-Plotkin et al., 2012). Cette induction a été par la suite montrée comme néfaste à l'acidification du lysosome et à la dégradation lysosomale (Busch et al., 2016).

Une étude visant à déterminer la pathogénicité associée à l'allèle « à risque » s'est penchée sur les niveaux d'expression et protéique de *TMEM106B* en fonction de son polymorphisme. Les résultats ont montré une expression identique entre les deux formes. En revanche, la quantité protéique de

TMEM106B est plus importante dans le cas de l'allèle à risque. Cette augmentation a été expliquée par une diminution de la dégradation de la protéine. Bien que cela n'ait jamais été montré, l'une des hypothèses associées au risque de l'un des allèles porte sur l'absence d'une modification post-traductionnelle de TMEM106B au niveau de l'asparagine 183 de la protéine « à risque » (Nicholson et al., 2013).

De par l'impact de *TMEM106B* dans le développement de la DFT et dans le devenir du lysosome, une étude s'est intéressée à la survie de patients DFT porteurs d'une mutation dans le gène *PGRN* en fonction des allèles de *TMEM106B*. Les analyses ont mis en évidence une espérance de vie plus faible chez les patients portant deux allèles « à risque » en comparaison aux patients portant 1 ou 2 allèles protecteurs. Cette diminution de la survie s'accompagne d'une diminution de la quantité plasmique de *PGRN* (Cruchaga et al., 2011).

Dans l'optique d'une compréhension partielle des mécanismes pathologiques associés à la DFT, des études récentes ont porté sur le potentiel effet protecteur d'une répression de *TMEM106B* dans des modèles murins de DFT.

Tout d'abord, dans un modèle *PGRN*, il a été montré que l'haploinsuffisance de *Tmem106b* ne permettait pas un rétablissement partiel du comportement ou d'une activité lysosomale comparable à celle des souris sauvages (Arrant et al., 2018). Néanmoins, la même année, une seconde étude sur un modèle similaire a évalué l'effet de l'extinction complète de *Tmem106b*. Les résultats obtenus sont contradictoires avec ceux de la première étude. En effet, il semblerait que la répression complète de *Tmem106b* permette un rétablissement du comportement anxigène (test en champ ouvert) des souris mutantes. Les altérations associées au lysosome sont également reversées (Klein et al., 2017). En accord avec les données de cette dernière étude, il a été montré que, dans le cas de l'extinction du gène *Pgrn*, la surexpression de *Tmem106b* entraîne une aggravation du phénotype lysosomale, avec une accumulation plus importante de lipofuscine et de lysosomes (Zhou et al., 2017).

L'effet de la répression de *Tmem106b* a également été étudié dans un modèle *C9orf72*. Les résultats montrent un maintien des troubles comportementaux et de l'accumulation d'inclusions positives à TDP43 chez les souris DFT n'exprimant plus *Tmem106b* (Nicholson et al., 2018).

Enfin, la répression de *Tmem106b* semble avoir un effet bénéfique dans les neurones exprimant le mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>*. Cette répression permet un meilleur trafic des lysosomes le long des neurites (Clayton et al., 2018). Cette analyse ne montre cependant aucune donnée comportementale.

L'ensemble de ces analyses montrent donc un rôle de TMEM106B dans l'homéostasie protéique. Les mécanismes d'action de cette protéine semblent doubles et contradictoires, avec un rôle négatif de la protéine dans le trafic rétrograde des lysosomes mais aussi un possible rôle dans l'acidification du

lysosome par interaction avec AP1, une ATPase impliquée dans l'acidification du lysosome (Klein et al., 2017).

Les données aussi bien de répression que d'induction de *TMEM106B* indiquent que la régulation de ce gène est un facteur clé dans l'homéostasie lysosomale et qu'une induction ou une répression trop importante conduit à un dysfonctionnement lysosomale et à la mort cellulaire (Suzuki and Matsuoka, 2016).

## 5. Le lysosome au-delà de la dégradation protéique

Cette accumulation de lysosomes impacte l'homéostasie cellulaire au-delà de l'encombrement stérique et de la formation d'agrégats protéiques. En effet, le lysosome joue également un rôle dans l'apport et la conversion de lipides dans les neurones. Les lipides par liaison avec des lipoprotéines (ApoC1, ApoE) traversent la barrière hémato-encéphalique puis par interaction des lipoprotéines avec des récepteurs aux LDL (low density lipoprotein), ces lipides sont internalisés par endocytose. Une fois l'endosome fusionné avec le lysosome, les lipases et protéases dégradent les lipoprotéines. Certains lipides, notamment le cholestérol et les acides gras simples, pourront alors rejoindre le cytoplasme *via* des transporteurs au niveau de la membrane lysosomale. Les lipides peuvent également rentrer dans la cellule sous la forme de gouttelettes lipidiques. Ces structures seront prises en charge par l'autophagosome puis, après fusion avec le lysosome, les lipides seront libérés dans le cytoplasme.

Les lipases lysosomales jouent également un rôle dans le métabolisme lipidique en convertissant certains lipides complexes au besoin du neurone. Cependant, on retrouve dans la plupart des maladies de stockage lysosomal une accumulation de certains types de lipides (sphingolipides, gangliosides, sphingomyéline) parfois associée à une diminution de l'efflux de cholestérol (Filocamo and Morrone, 2011, Infante et al., 2008).

Par ailleurs, il est connu que les lipides jouent un rôle important au niveau du muscle dans la SLA puisqu'il a été montré que les fibres musculaires glycolytiques étaient les premières à dégénérer (Hegedus et al., 2007). De plus, Palamiuc et al ont mis en évidence un changement général du métabolisme musculaire, avec une augmentation de la proportion de fibres oxydatives au niveau du muscle de souris *SOD1<sup>G86R</sup>* (Palamiuc et al., 2015). Les lipides seraient donc un carburant permettant le maintien des fonctions musculaires suite à l'insulino-résistance mise en place.

Cependant le rôle des lipides dans le SNC et plus particulièrement dans les neurones vulnérables dans la SLA est encore peu étudié. Dans une étude, les patients SLA présentaient aux niveaux cervical et lombaire une accumulation de céramide et de cholestérol. De plus, l'inhibition de la sérine palmito-transférase, une enzyme impliquée dans la formation d'un précurseur du céramide diminue la mortalité des neurones en culture (Cutler et al., 2002).

### III. CHMP2B<sup>intron5</sup> : vers un modèle plus humain

A travers la caractérisation de la lignée murine CHMP2B<sup>intron5</sup> effectuée durant ma thèse, nous avons pu mettre en évidence un certain nombre de caractéristiques pathologiques en réponse à l'expression neuronale du mutant humain CHMP2B<sup>intron5</sup>. Cependant, le modèle murin actuellement utilisé, bien que représentatif du syndrome SLA-DFT présente quelques limites inhérentes pour certaines à la méthode employée afin de le développer. C'est également le cas des 3 autres modèles animaux « CHMP2B<sup>intron5</sup> » développés à ce jour. En effet, la transgénèse classique pose plusieurs limites.

Tout d'abord, le site d'insertion de la séquence d'intérêt est aléatoire. Ainsi, l'ADN exogène peut s'insérer dans la région clé d'un gène (vraisemblablement un intron), entraînant une altération de son expression ou son épissage. Dans notre modèle, la séquence codant le transgène est située au niveau de l'intron 1 du gène *Atp2b1* responsable de l'export actif du calcium. Si une première étude de l'expression de ce gène n'a pas montré de modification de son expression chez les souris transgéniques, notre étude transcriptomique a toutefois montré une importante répression de *Atp2b1* au niveau de la moelle épinière lombaire de souris HO dès le stade asymptotique (Vernay et al., 2016).

La seconde limite de notre modèle est le recours à un promoteur différent de celui du gène d'intérêt. En effet, notre modèle ainsi que celui de Gao (Gascon et al., 2014) ne permettent qu'une expression très localisée du mutant (Figure 25). Certes, lors de la modélisation d'une maladie multicellulaire, l'expression restreinte à un type cellulaire permet d'étudier l'impact de ce type cellulaire sur les autres et sur le développement de la pathologie. Cependant, cela éloigne le modèle de la maladie originelle. Le modèle de Gao est encore plus restrictif que le nôtre puisque seuls les neurones du prosencéphale (cortex, thalamus, hypothalamus) expriment le mutant. Dans le modèle développé par Isaacs, le promoteur utilisé est celui de la protéine prion du hamster. La littérature semble indiquer que, bien que la protéine prion soit exprimée dans de nombreux tissus, son expression se concentre principalement dans le système nerveux central (neurones/glie). Dans le muscle squelettique en revanche, son expression est presque nulle (Peralta and Eyestone, 2009, Race et al., 1995).

Ce type de modèle animal présente également le problème du niveau d'expression du transgène, associé ou non au nombre d'allèle. Ici les trois modèles murins ne reflètent pas la pathologie observée chez le patient (Figure 25). Dans notre modèle, de par le nombre important de copies de la séquence codant le mutant, l'expression de ce dernier est beaucoup plus importante que celle de *Chmp2b*, même si un seul allèle est concerné chez les souris HE. Dans le modèle murin de Gao, l'expression du transgène semble la même que celle de *Chmp2b* (Gascon et al., 2014). A noter toutefois que l'expression du mutant est limitée aux neurones contrairement à celle de *Chmp2b*. Ainsi il est fort possible que le mutant soit davantage exprimé que *Chmp2b* dans les neurones mais que la quantification en présence majoritaire de glies (n'exprimant pas le transgène) moyenne cette expression. Enfin, dans le modèle d'Isaacs (Ghazi-Noori et al., 2012), l'expression du mutant est

équivalente à celle de *Chmp2b*. Cependant, des analyses sur des cerveaux de patients porteurs de cette mutation ont montré que l'expression du transgène était plus de deux fois inférieure à celle de *CHMP2B* et ce, même en cumulant l'expression des deux transcrits « intron 5 » et « Δ10 » (Urwin et al., 2010). Ainsi, dans les trois modèles murins existants, le ratio d'expression *CHMP2B<sup>intron5</sup>/Chmp2b* est plus élevé que chez les patients porteurs de la mutation « intron 5 ».

Enfin, chez les patients, la mutation « intron 5 » affecte un allèle, créant une haploinsuffisance du gène *CHMP2B*. Les patients présentent ainsi un allèle sain et un allèle muté, ce qui entraîne vraisemblablement une diminution de la quantité de protéine CHMP2B traduite (cela n'a toutefois jamais été vérifié). Cependant, dans chacun des 4 modèles développés, la séquence mutée s'insère aléatoirement dans le génome et les deux allèles de *Chmp2b* restent intacts. Bien que l'extinction complète de *Chmp2b* n'affecte ni la survie des souris, ni la formation d'agrégats protéiques (Ghazi-Noori et al., 2012) il est possible et même logique que la perte d'un allèle provoque des dérégulations transcriptomiques, ce qui n'est pas modélisé dans les lignées *CHMP2B<sup>intron5</sup>* actuelles.

Pour pallier toutes les limites de ces modèles, nous avons développé au laboratoire un nouveau modèle murin par knock-in. Ainsi, les souris mutantes expriment le transgène *CHMP2B<sup>intron5</sup>* à la place du gène *Chmp2b* au niveau d'un allèle chez les souris HE et des 2 allèles chez les souris HO (les souris HO n'expriment donc plus du tout le gène *Chmp2b*). En plus de reproduire (chez les souris HE) l'haploinsuffisance retrouvée chez les patients, le promoteur du mutant sera le même que chez le patient, respectant son niveau d'expression dans l'ensemble des tissus. Ce knock-in, en cours de caractérisation, devrait davantage modéliser la pathologie humaine que les modèles animaux existants.






	Méthode de transgénèse	Localisation du mutant	Ratio Tg/WT	Nb d'allèles atteints	Caractéristiques histologiques/biochimiques	Caractéristiques comportementales	Mort prématurée
 Gao et al (2009)	Classique	Ubiquitaire	?	1	-Dégénérescence des ommatidies -Induction de <i>Jnk</i> (apoptose)		
 Isaacs et al (2012)	Classique	Principalement neurones/glie	1/1	2	-Astrocytose -Microgliose -Agréats P62 <sup>+</sup> /UBI <sup>+</sup> -Accumulation d'endosomes tardifs	-Diminution des interactions sociales -Diminution de la force musculaire	Oui
 Gao et al (2014)	Classique	Neurones du cortex frontal	1/1	?	-Astrocytose -Agréats P62 <sup>+</sup> -Induction de Gria 2 et 4 -Répression de miR-124	-Diminution des interactions sociales -Diminution de l'anxiété	
 Rene et al (2016)	Classique	Neurones	>2/1 (HE) >4/1 (HO)	1 (HE) 2 (HO)	-Astrocytose -Microgliose -Agréats P62 <sup>+</sup> /UBI <sup>+</sup> -Atteintes de la JNM -Hypermétabolisme	-Diminution des interactions sociales -Diminution de l'anxiété -Diminution de la force musculaire	Oui
 Rene et al	Additionnelle (Knock-in)	identique à celle de Chmp2b	? (HE) ? (HO)	1 (HE) 2 (HO)	?	?	?

Figure 25 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des différents modèles animaux CHMP2B<sup>intron5</sup>



## IV. L'autophagie : acteur central du syndrome SLA-DFT

L'autophagie est un processus clé dans l'homéostasie cellulaire. Ce processus est altéré dans un très grand nombre de maladies comme les maladies cardio-vasculaires (Martinet et al., 2007), les cancers (Mathew et al., 2007), les maladies hépatiques (Ueno and Komatsu, 2017) mais surtout les maladies du muscle (Grumati and Bonaldo, 2012) et les maladies neurodégénératives (Nixon, 2013). De plus, dans la SLA comme dans la DFT, de nombreux processus dérégulés sont liés à l'autophagie.

### 1. Autophagie et stress du RE

Comme abordé dans l'introduction, le stress du RE associé à la réponse UPR est un mécanisme mis en place chez de nombreux patients atteints du syndrome SLA-DFT. Ce mécanisme se déclenche dans la cellule lors de l'accumulation de matériel au niveau du RE ou de l'accumulation de protéines mal conformées entraînant une induction de l'autophagie afin de rétablir l'homéostasie protéique (Fouillet et al., 2012). En cas d'échec, la cellule (en l'occurrence le neurone dans le syndrome SLA-DFT) entre en apoptose.

### 2. Autophagie et stress oxydatif

Peu de temps après la découverte de l'implication du gène *SOD1* dans la SLA, des études ont porté sur le stress oxydatif au niveau des régions les plus atteintes et ont mis en évidence une augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), impactant les protéines (Shaw et al., 1995), les lipides (Shibata et al., 2001) et l'ADN (Ferrante et al., 1997). La plus grande source d'ERO est la mitochondrie. Il a été montré que le stress oxydatif entraînait une induction de la macroautophagie (Shao et al., 2016) ainsi que de l'AMC (Su et al., 2016). De plus, en cas de dysfonctionnement des mitochondries, des protéines comme NIX ou parkin marqueront la membrane externe des mitochondries altérées permettant leur acheminement vers l'autophagosome *via* leur interaction avec LC3 (Narendra et al., 2008, Rodriguez-Hernandez et al., 2009).

### 3. Autophagie et hypoxie

L'hypoxie est un facteur qui concerne les patients atteints de SLA puisqu'une étude a montré qu'en plus de souffrir d'hypoxie nocturne, les patients présentent un déficit cognitif consécutif à cette insuffisance respiratoire (Park et al., 2013). Dans le neurone, l'hypoxie entraîne une induction du processus autophagique induit par BNPI3 lui-même induit par HIF, le facteur majeur de l'hypoxie (Azad et al., 2008, Bellot et al., 2009, Song et al., 2018, Tan et al., 2018).

### 4. Autophagie et réparation de l'ADN

Bien qu'ils soient associés depuis plusieurs décennies à la SLA (Tandan et al., 1987), les dommages de l'ADN ainsi que sa réparation sont deux aspects émergeant de cette maladie.

Il existe deux types de cassure de l'ADN : simple ou double brin. Afin de réparer les lésions double brin, la cellule pourra employer la recombinaison homologue ou la recombinaison non homologue par jonction des extrémités (RNHJE). En cas de cassure simple brin, la réparation se fait par l'un de ces trois mécanismes : réparation par excision d'une base (REB), réparation par excision d'un nucléotide (REN) ou réparation des mésappariements (RM).

Des études ont mis en évidence une induction de marqueurs de la REB au niveau de la moelle épinière et du cortex moteur de patients atteints de SLA (Kim et al., 2004, Shaikh and Martin, 2002). Ces dommages de l'ADN s'expliquent par plusieurs facteurs. Premièrement, parmi les gènes liés à la SLA, plusieurs sont impliqués dans la réparation de l'ADN. C'est le cas de *FUS*, dont la mutation  $\Delta$ NLS (entraînant la perte du domaine d'import nucléaire de la protéine) empêche le recrutement de FUS au niveau du site de dommage de l'ADN, exacerbant le stress du neurone et conduisant à sa dégénérescence (Higelin et al., 2016, Naumann et al., 2018). Les mutations de *C9ORF72* (par répétition d'un motif hexanucléotidique) sont également à l'origine d'une vulnérabilité accrue aux dommages de l'ADN. Ces répétitions entraînent la formation de structures appelées « boucles R » ou « quadruplexes G » qui, lors de la transcription du brin complémentaire, sont sujettes à l'action de nucléases, de déaminases ou d'enzymes de réparations (Moruno-Manchon et al., 2017, Skourti-Stathaki and Proudfoot, 2014). L'induction des marqueurs de la réparation de l'ADN chez les patients SLA s'explique également par l'important stress oxydatif au sein des neurones vulnérables. En effet, il a été montré que les ERO étaient capables d'induire des dommages au niveau de l'ADN (Kohen and Nyska, 2002).

Ces mécanismes de réparation peuvent être régulés par le processus d'autophagie. Hewitt et al ont montré que la protéine P62 régulait négativement le processus de réparation double brin de l'ADN en dégradant par la voie protéasomale les protéines RAD51 et FLNA, deux acteurs importants dans la RH (Hewitt et al., 2016). La même année, une autre équipe a mis en évidence son rôle répresseur dans l'ubiquitination de la chromatine, entraînant une répression de la réparation des cassures double brin de l'ADN. Les mêmes résultats ont été obtenus lors du blocage du processus autophagique montrant que ce dernier favorise la réparation de l'ADN par séquestration et dégradation de P62 (Park et al., 2014, Wang Y et al., 2016). La protéine UVRAG joue aussi un rôle dans la prise en charge de cassures double brin. En effet, par induction de l'autophagie, UVRAG favorise la réparation de l'ADN. Il peut également former un complexe avec DDB1, DDB2, CUL4A et RBX1 au niveau du site de lésion ce qui permet la réparation de l'ADN (Yang et al., 2016a).

L'autophagie peut également induire la réparation des cassures simple brin en particulier par des mécanismes de REN. Des études sur des fibroblastes murins ont montré que l'extinction de *Atg5* (et donc le blocage de l'autophagie) inhibait la REN par l'intermédiaire d'une répression de *Xpc* et d'une rétention de DDB2 (Qiang et al., 2016). La protéine UVRAG, impliquée dans les réparations de

cassures double brin, joue également un rôle dans la REN. Elle est recrutée au niveau du site de lésion par interaction avec DDB1 puis forme un complexe avec CUL4A et l'ubiquitine ligase DDB2, permettant le recrutement de XPC et la réparation de l'ADN (Yang et al., 2016b).

## 5. Autophagie et apoptose

Le lien entre autophagie et apoptose est encore mal caractérisé. Pourtant, certaines connections ont été mises en évidence. Tout d'abord, l'autophagie est un processus davantage lié à la survie de la cellule qu'à son entrée en apoptose en condition de stress (comme lors d'une déprivation en nutriments, d'accumulation de protéines mal conformées ou d'ERO). Cependant, il peut arriver dans certains cas que ce processus induise l'apoptose.

La protéine P62 joue un rôle majeur et ambivalent dans le devenir de la cellule. P62 peut favoriser l'activation de NF- $\kappa$ B, un médiateur de la survie cellulaire par activation et poly-ubiquitination de TRAF6 (Wooten et al., 2005). De plus P62 peut cibler la dégradation de protéines pro-apoptotiques comme la caspase 8 (Hou et al., 2010). Néanmoins, P62 a également été montré comme associée à la voie pro-apoptotique, en permettant l'agrégation de CUL3, une ubiquitine-ligase activant les récepteurs de mort DDR4 et DDR5 (Jin et al., 2009).

L'inhibition de l'apoptose par l'autophagie peut également passer par la mitophagie. En réduisant le nombre de mitochondries, la cellule peut limiter la quantité de cytochrome C libéré dans le cytoplasme. Radoshevich et al ont montré que l'interaction entre ATG3 et ATG12, deux protéines associées à l'autophagie, favorisait l'apoptose par répression de gènes codant des protéines anti-apoptotiques (Radoshevich et al., 2010). Cependant, l'induction de l'autophagie entraîne la formation du complexe ATG5-ATG12 (voir III.1.B.c. La macroautophagie) et empêche l'interaction entre ATG12 et ATG3. Dans ce cas de figure, l'autophagie inhiberait l'apoptose.

Ainsi, l'ensemble de ces données tend à prouver que le processus autophagique est primordial dans la SLA puisqu'il permet de rétablir l'homéostasie cellulaire lors de l'hypoxie, d'un stress oxydatif, d'un stress du RE ou de l'instabilité du génome (en promouvant la réparation de l'ADN). Il est le dernier rempart avant l'entrée de la cellule en apoptose (Figure 26). Or, dans de nombreux cas de SLA et de DFT, ce processus est bloqué ou réprimé, empêchant un retour à l'homéostasie et promouvant l'apoptose.

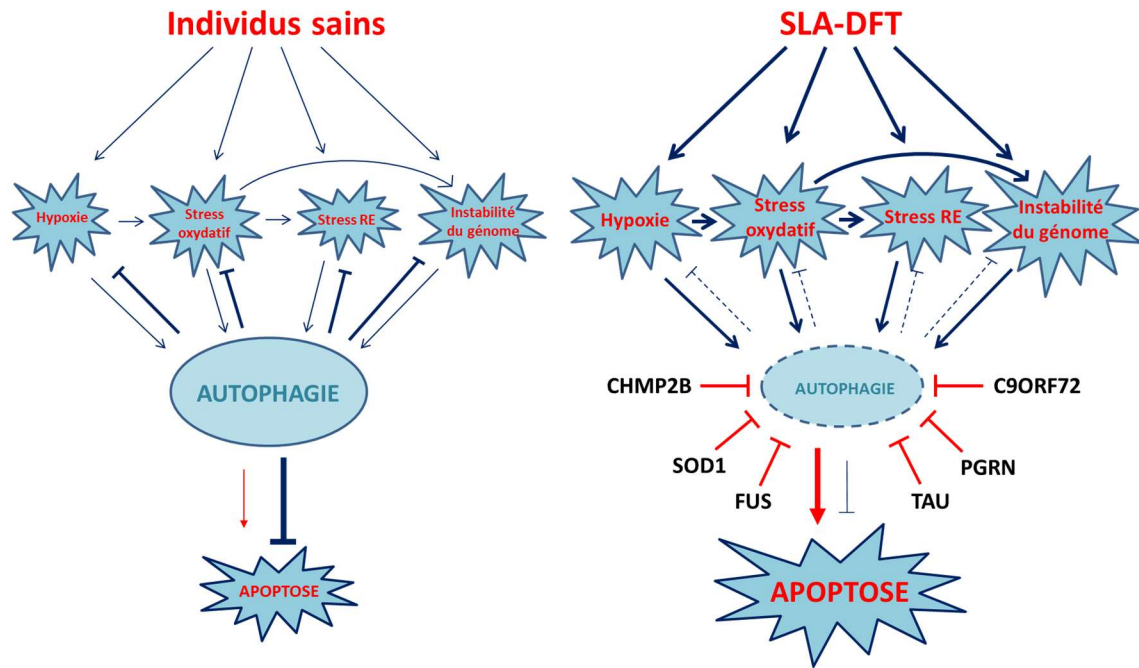


Figure 26 : Rôle de l'autophagie dans l'homéostasie cellulaire

Dans la cellule, l'autophagie permet de maintenir l'homéostasie cellulaire en réduisant le stress oxydatif, les dommages de l'ADN et en maintenant l'homéostasie protéique. Les patients atteints de la SLA présentent une hypoxie, une induction du stress oxydatif, de marqueurs du stress du RE et une instabilité du génome. Ces mécanismes pathologiques peuvent exacerber les autres comme l'hypoxie qui conduit au stress oxydatif pouvant être à l'origine d'un stress du RE et de dommages au niveau de l'ADN. Chacun de ces mécanismes pathologiques conduit à l'induction de l'autophagie qui, en conditions physiologiques, favorise un retour à l'homéostasie cellulaire. Cependant, dans de nombreux cas de SLA, ce processus est réprimé ou bloqué menant à l'entrée du neurone en apoptose.

# Conclusion

## Conclusion

La SLA et la DFT sont deux maladies neurodégénératives incurables encore peu comprises à ce jour en raison de leur étiologie complexe et du grand nombre de mutations qui leur sont associées (plus de 400 mutations différentes répertoriées dans environ 30 gènes).

Maladies multifactorielles, la SLA et la DFT sont également des maladies multicellulaires dans lesquelles différents types cellulaires comme les neurones, la glie ou les fibres musculaires sont affectés. De plus, les perturbations consécutives au développement de ces maladies portent sur un grand nombre de processus au sein de ces différentes cellules, allant du stress oxydatif à l'homéostasie protéique en passant par l'excitotoxicité glutamatergique ou encore le transport axonal.

L'étude transcriptomique que nous avons menée nous a permis de confirmer la présence d'atteintes multiples en montrant une forte induction de l'inflammation accompagnée d'une altération du métabolisme lipidique avant même l'apparition des symptômes. A des stades plus avancés, nous avons pu mettre en évidence une accentuation du stress oxydatif ainsi que des perturbations du transport de neurotransmetteurs et de l'activité électrique du neurone. Cette étude est la première réalisée sur un modèle de SLA-DFT exprimant le mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> et à un stade pré-symptomatique. Notre étude longitudinale nous a ainsi permis de déterminer quels processus étaient altérés avant et après la mise en place des symptômes moteurs.

Nous avons également montré une altération de gènes liés au lysosome et donc au processus autophagique. Une étude approfondie de ce processus a révélé une perturbation de stockage lysosomale dans les neurones exprimant *CHMP2B*<sup>intron5</sup>, c'est-à-dire une incapacité de la cellule à dégrader et recycler ses constituants élémentaires localisés dans le lysosome, accumulation accompagnée d'une répression de l'autophagie. D'autres études de la mutation « intron 5 » évoquent également une altération du trafic endolysosomal qui, sans réfuter ce stockage lysosomale pathologique, ajouterait une perturbation au sein du processus autophagique. Nos données proposent un rôle de la répression de *Gnptab* dans cette altération, par une diminution de l'adressage des hydrolases acides vers le lysosome. Cette hypothèse nécessite de plus amples investigations en commençant par la vérification au niveau protéique de la répression de GNPTAB. Il serait aussi intéressant d'analyser l'effet d'un rétablissement de *Gnptab* sur le métabolisme lysosomale.

Sur l'ensemble des gènes connus à ce jour comme induisant la SLA, *CHMP2B* est le seul lié à une maladie de stockage lysosomale. En revanche, des altérations similaires ont été retrouvées chez des patients DFT porteurs d'une mutation dans le gène *PGRN*, à ceci près que la protéine PGRN est associée au métabolisme lysosomale. La complexité du mutant *CHMP2B*<sup>intron5</sup> tient donc du fait que ses mécanismes pathologiques sont liés à un gain de fonction de la protéine mutante, ce qui en fait un cas à part dans les maladies de stockage lysosomale.

# Bibliographie

## Bibliographie

- Abhinav, K., Stanton, B., Johnston, C., Hardstaff, J., Orrell, R.W., Howard, R., Clarke, J., Sakel, M., Ampong, M.A., Shaw, C.E., Leigh, P.N. and Al-Chalabi, A., 2007. Amyotrophic lateral sclerosis in South-East England: a population-based study. The South-East England register for amyotrophic lateral sclerosis (SEALS Registry). *Neuroepidemiology*. 29, 44-8. 10.1159/000108917.
- Agarraberes, F.A. and Dice, J.F., 2001. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci*. 114, 2491-9.
- Ahmad, S.T., Sweeney, S.T., Lee, J.A., Sweeney, N.T. and Gao, F.B., 2009. Genetic screen identifies serpin5 as a regulator of the toll pathway and CHMP2B toxicity associated with frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 12168-73. 10.1073/pnas.0903134106.
- Ahmed, R.M., Irish, M., Piguet, O., Halliday, G.M., Ittner, L.M., Farooqi, S., Hodges, J.R. and Kiernan, M.C., 2016. Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: distinct and overlapping changes in eating behaviour and metabolism. *Lancet Neurol*. 15, 332-42. 10.1016/S1474-4422(15)00380-4.
- Alers, S., Loffler, A.S., Paasch, F., Dieterle, A.M., Keppeler, H., Lauber, K., Campbell, D.G., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Wesselborg, S. and Stork, B., 2011. Atg13 and FIP200 act independently of Ulk1 and Ulk2 in autophagy induction. *Autophagy*. 7, 1423-33.
- Aplin, A., Jasionowski, T., Tuttle, D.L., Lenk, S.E. and Dunn, W.A., Jr., 1992. Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J Cell Physiol*. 152, 458-66. 10.1002/jcp.1041520304.
- Arciniegas, D.B. and Anderson, C.A., 2013. Donepezil-induced confusional state in a patient with autopsy-proven behavioral-variant frontotemporal dementia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 25, E25-6. 10.1176/appi.neuropsych.12060158.
- Armstrong, G.A. and Drapeau, P., 2013. Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS. *Hum Mol Genet*. 22, 4282-92. 10.1093/hmg/ddt278.
- Arrant, A.E., Nicholson, A.M., Zhou, X., Rademakers, R. and Roberson, E.D., 2018. Partial Tmem106b reduction does not correct abnormalities due to progranulin haploinsufficiency. *Mol Neurodegener*. 13, 32. 10.1186/s13024-018-0264-6.
- Asao, H., Sasaki, Y., Arita, T., Tanaka, N., Endo, K., Kasai, H., Takeshita, T., Endo, Y., Fujita, T. and Sugamura, K., 1997. Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine-induced cell growth. *J Biol Chem*. 272, 32785-91.
- Ash, P.E., Bieniek, K.F., Gendron, T.F., Caulfield, T., Lin, W.L., DeJesus-Hernandez, M., van Blitterswijk, M.M., Jansen-West, K., Paul, J.W., 3rd, Rademakers, R., Boylan, K.B., Dickson, D.W. and Petrucelli, L., 2013. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron*. 77, 639-46. 10.1016/j.neuron.2013.02.004.
- Atkin, J.D., Farg, M.A., Walker, A.K., McLean, C., Tomas, D. and Horne, M.K., 2008. Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 30, 400-7. 10.1016/j.nbd.2008.02.009.
- Auteri, J.S., Okada, A., Bochaki, V. and Dice, J.F., 1983. Regulation of intracellular protein degradation in IMR-90 human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol*. 115, 167-74. 10.1002/jcp.1041150210.
- Ayala, Y.M., Zago, P., D'Ambrogio, A., Xu, Y.F., Petrucelli, L., Buratti, E. and Baralle, F.E., 2008. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J Cell Sci*. 121, 3778-85. 10.1242/jcs.038950.



- Azad, M.B., Chen, Y., Henson, E.S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S.J. and Gibson, S.B., 2008. Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy*. 4, 195-204.
- Babst, M., Sato, T.K., Banta, L.M. and Emr, S.D., 1997. Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J*. 16, 1820-31. 10.1093/emboj/16.8.1820.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J. and Emr, S.D., 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J*. 17, 2982-93. 10.1093/emboj/17.11.2982.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B. and Emr, S.D., 2002. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*. 3, 283-9.
- Bach, M., Larance, M., James, D.E. and Ramm, G., 2011. The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *Biochem J*. 440, 283-91. 10.1042/BJ20101894.
- Backer, J.M. and Dice, J.F., 1986. Covalent linkage of ribonuclease S-peptide to microinjected proteins causes their intracellular degradation to be enhanced during serum withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83, 5830-4.
- Bak, T.H. and Hodges, J.R., 2004. The effects of motor neurone disease on language: further evidence. *Brain Lang*. 89, 354-61. 10.1016/S0093-934X(03)00357-2.
- Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A.D., Rollinson, S., Cannon, A., Dwosh, E., Neary, D., Melquist, S., Richardson, A., Dickson, D., Berger, Z., Eriksen, J., Robinson, T., Zehr, C., Dickey, C.A., Crook, R., McGowan, E., Mann, D., Boeve, B., Feldman, H. and Hutton, M., 2006. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*. 442, 916-9. 10.1038/nature05016.
- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L. and Cuervo, A.M., 2008. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol*. 28, 5747-63. 10.1128/MCB.02070-07.
- Bar-Sela, S., Reingold, S. and Richter, E.D., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis in a battery-factory worker exposed to cadmium. *Int J Occup Environ Health*. 7, 109-12. 10.1179/107735201800339470.
- Barschke, P., Oeckl, P., Steinacker, P., Ludolph, A. and Otto, M., 2017. Proteomic studies in the discovery of cerebrospinal fluid biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Proteomics*. 14, 769-777. 10.1080/14789450.2017.1365602.
- Baumeister, P., Luo, S., Skarnes, W.C., Sui, G., Seto, E., Shi, Y. and Lee, A.S., 2005. Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers. *Mol Cell Biol*. 25, 4529-40. 10.1128/MCB.25.11.4529-4540.2005.
- Baumer, D., Hilton, D., Paine, S.M., Turner, M.R., Lowe, J., Talbot, K. and Ansorge, O., 2010. Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations. *Neurology*. 75, 611-8. 10.1212/WNL.0b013e3181ed9cde.
- Bede, P. and Hardiman, O., 2018. Longitudinal structural changes in ALS: a three time-point imaging study of white and gray matter degeneration. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 19, 232-241. 10.1080/21678421.2017.1407795.
- Behzadnia, N., Golas, M.M., Hartmuth, K., Sander, B., Kastner, B., Deckert, J., Dube, P., Will, C.L., Urlaub, H., Stark, H. and Luhrmann, R., 2007. Composition and three-dimensional EM structure of double affinity-purified, human prespliceosomal A complexes. *EMBO J*. 26, 1737-48. 10.1038/sj.emboj.7601631.

- Bellingham, M.C., 2011. A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade? *CNS Neurosci Ther.* 17, 4-31. 10.1111/j.1755-5949.2009.00116.x.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J. and Mazure, N.M., 2009. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol.* 29, 2570-81. 10.1128/MCB.00166-09.
- Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Bouron, A., Sadoul, R. and Goldberg, Y., 2010. CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J Cell Sci.* 123, 2943-54. 10.1242/jcs.068817.
- Benajiba, L., Le Ber, I., Camuzat, A., Lacoste, M., Thomas-Anterion, C., Couratier, P., Legallic, S., Salachas, F., Hannequin, D., Decousus, M., Lacomblez, L., Guedj, E., Golfier, V., Camu, W., Dubois, B., Campion, D., Meininger, V., Brice, A., French, C. and Genetic Research Network on Frontotemporal Lobar Degeneration/Frontotemporal Lobar Degeneration with Motoneuron, D., 2009. TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol.* 65, 470-3. 10.1002/ana.21612.
- Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F.M., Oroz, L.G., Underwood, B.R., Pangalos, M.N., Schmitt, I., Wullner, U., Evert, B.O., O'Kane, C.J. and Rubinsztein, D.C., 2006. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet.* 15, 433-42. 10.1093/hmg/ddi458.
- Bian, H., Van Swieten, J.C., Leight, S., Massimo, L., Wood, E., Forman, M., Moore, P., de Koning, I., Clark, C.M., Rosso, S., Trojanowski, J., Lee, V.M. and Grossman, M., 2008. CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known pathology. *Neurology.* 70, 1827-35. 10.1212/01.wnl.0000311445.21321.fc.
- Blasco, H., Garcon, G., Patin, F., Veyrat-Durebex, C., Boyer, J., Devos, D., Vourc'h, P., Andres, C.R. and Corcia, P., 2017. Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. *Can J Neurol Sci.* 44, 90-95. 10.1017/cjn.2016.284.
- Blasco, H., Corcia, P., Pradat, P.F., Bocca, C., Gordon, P.H., Veyrat-Durebex, C., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Moreau, C., Devos, D., Andres, C.R. and Emond, P., 2013. Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. *J Proteome Res.* 12, 3746-54. 10.1021/pr400376e.
- Blasco, H., Corcia, P., Moreau, C., Veau, S., Fournier, C., Vourc'h, P., Emond, P., Gordon, P., Pradat, P.F., Praline, J., Devos, D., Nadal-Desbarats, L. and Andres, C.R., 2010. 1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 5, e13223. 10.1371/journal.pone.0013223.
- Blokhuis, A.M., Groen, E.J., Koppers, M., van den Berg, L.H. and Pasterkamp, R.J., 2013. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 125, 777-94. 10.1007/s00401-013-1125-6.
- Blommaert, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelarova, H. and Meijer, A.J., 1997. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem.* 243, 240-6.
- Boccardi, M., Laakso, M.P., Bresciani, L., Galluzzi, S., Geroldi, C., Beltramello, A., Soininen, H. and Frisoni, G.B., 2003. The MRI pattern of frontal and temporal brain atrophy in fronto-temporal dementia. *Neurobiol Aging.* 24, 95-103.
- Bodon, G., Chassefeyre, R., Pernet-Gallay, K., Martinelli, N., Effantin, G., Hulsik, D.L., Belly, A., Goldberg, Y., Chatellard-Cause, C., Blot, B., Schoehn, G., Weissenhorn, W. and Sadoul, R., 2011. Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. *J Biol Chem.* 286, 40276-86. 10.1074/jbc.M111.283671.

- Bogdanov, M., Brown, R.H., Matson, W., Smart, R., Hayden, D., O'Donnell, H., Flint Beal, M. and Cudkowicz, M., 2000. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic Biol Med.* 29, 652-8.
- Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.S., Guarnieri, M., Xu, Z.S., Wong, P.C., Brown, R.H., Jr., Price, D.L., Sisodia, S.S. and Cleveland, D.W., 1994. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 8292-6.
- Borroni, B., Alberici, A., Grassi, M., Rozzini, L., Turla, M., Zanetti, O., Bianchetti, A., Gilberti, N., Bonvicini, C., Volta, G.D., Rozzini, R. and Padovani, A., 2011. Prevalence and demographic features of early-onset neurodegenerative dementia in Brescia County, Italy. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 25, 341-4. 10.1097/WAD.0b013e3182147f80.
- Boumediene, F., Druet-Cabanac, M., Marin, B., Preux, P.M., Allee, P. and Couratier, P., 2011. Contribution of geolocalisation to neuroepidemiological studies: incidence of ALS and environmental factors in Limousin, France. *J Neurol Sci.* 309, 115-22. 10.1016/j.jns.2011.07.002.
- Bourke, S.C., Tomlinson, M., Williams, T.L., Bullock, R.E., Shaw, P.J. and Gibson, G.J., 2006. Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 5, 140-7. 10.1016/S1474-4422(05)70326-4.
- Boxer, A.L., Knopman, D.S., Kaufer, D.I., Grossman, M., Onyike, C., Graf-Radford, N., Mendez, M., Kerwin, D., Lerner, A., Wu, C.K., Koestler, M., Shapira, J., Sullivan, K., Klepac, K., Lipowski, K., Ullah, J., Fields, S., Kramer, J.H., Merrilees, J., Neuhaus, J., Mesulam, M.M. and Miller, B.L., 2013. Memantine in patients with frontotemporal lobar degeneration: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 12, 149-56. 10.1016/S1474-4422(12)70320-4.
- Brady, O.A., Zheng, Y., Murphy, K., Huang, M. and Hu, F., 2013. The frontotemporal lobar degeneration risk factor, TMEM106B, regulates lysosomal morphology and function. *Hum Mol Genet.* 22, 685-95. 10.1093/hmg/ddt475.
- Braulke, T. and Bonifacino, J.S., 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1793, 605-14. 10.1016/j.bbamcr.2008.10.016.
- Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., Quest, A.F. and Lavandero, S., 2013. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 301, 215-90. 10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1.
- Brettschneider, J., Van Deerlin, V.M., Robinson, J.L., Kwong, L., Lee, E.B., Ali, Y.O., Safren, N., Monteiro, M.J., Toledo, J.B., Elman, L., McCluskey, L., Irwin, D.J., Grossman, M., Molina-Porcel, L., Lee, V.M. and Trojanowski, J.Q., 2012. Pattern of ubiquilin pathology in ALS and FTLN indicates presence of C9ORF72 hexanucleotide expansion. *Acta Neuropathol.* 123, 825-39. 10.1007/s00401-012-0970-z.
- Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., Munsat, T.L. and World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron, D., 2000. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 1, 293-9.
- Brown, R.H. and Al-Chalabi, A., 2017. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med.* 377, 162-172. 10.1056/NEJMra1603471.
- Budovskaya, Y.V., Stephan, J.S., Deminoff, S.J. and Herman, P.K., 2005. An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 13933-8. 10.1073/pnas.0501046102.
- Budovskaya, Y.V., Stephan, J.S., Reggiori, F., Klionsky, D.J. and Herman, P.K., 2004. The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279, 20663-71. 10.1074/jbc.M400272200.

- Buhour, M.S., Doidy, F., Laisney, M., Pitel, A.L., de La Sayette, V., Viader, F., Eustache, F. and Desgranges, B., 2017. Pathophysiology of the behavioral variant of frontotemporal lobar degeneration: A study combining MRI and FDG-PET. *Brain Imaging Behav.* 11, 240-252. 10.1007/s11682-016-9521-x.
- Busch, J.I., Unger, T.L., Jain, N., Tyler Skrinak, R., Charan, R.A. and Chen-Plotkin, A.S., 2016. Increased expression of the frontotemporal dementia risk factor TMEM106B causes C9orf72-dependent alterations in lysosomes. *Hum Mol Genet.* 25, 2681-2697. 10.1093/hmg/ddw127.
- Caballero, B., Wang, Y., Diaz, A., Tasset, I., Juste, Y.R., Stiller, B., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. and Cuervo, A.M., 2018. Interplay of pathogenic forms of human tau with different autophagic pathways. *Aging Cell.* 17, 10.1111/accel.12692.
- Cagnin, A., Rossor, M., Sampson, E.L., Mackinnon, T. and Banati, R.B., 2004. In vivo detection of microglial activation in frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 56, 894-7. 10.1002/ana.20332.
- Calderilla-Barbosa, L., Seibenhener, M.L., Du, Y., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Yan, J., Wooten, M.W. and Wooten, M.C., 2014. Interaction of SQSTM1 with the motor protein dynein--SQSTM1 is required for normal dynein function and trafficking. *J Cell Sci.* 127, 4052-63. 10.1242/jcs.152363.
- Carbone, M., Duty, S. and Rattray, M., 2012. Riluzole elevates GLT-1 activity and levels in striatal astrocytes. *Neurochem Int.* 60, 31-8. 10.1016/j.neuint.2011.10.017.
- Carlton, J.G. and Martin-Serrano, J., 2007. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science.* 316, 1908-12. 10.1126/science.1143422.
- Carreras, I., Yuruker, S., Aytan, N., Hossain, L., Choi, J.K., Jenkins, B.G., Kowall, N.W. and Dedeoglu, A., 2010. Moderate exercise delays the motor performance decline in a transgenic model of ALS. *Brain Res.* 1313, 192-201. 10.1016/j.brainres.2009.11.051.
- Cedarbaum, J.M., Stambler, N., Malta, E., Fuller, C., Hilt, D., Thurmond, B. and Nakanishi, A., 1999. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci.* 169, 13-21.
- Chan, E.Y., Kir, S. and Tooze, S.A., 2007. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem.* 282, 25464-74. 10.1074/jbc.M703663200.
- Chang, C.F., Lee, Y.C., Lee, K.H., Lin, H.C., Chen, C.L., Shen, C.J. and Huang, C.C., 2016. Therapeutic effect of berberine on TDP-43-related pathogenesis in FTL and ALS. *J Biomed Sci.* 23, 72. 10.1186/s12929-016-0290-z.
- Chassefeyre, R., Martinez-Hernandez, J., Bertaso, F., Bouquier, N., Blot, B., Laporte, M., Fraboulet, S., Coute, Y., Devoy, A., Isaacs, A.M., Pernet-Gallay, K., Sadoul, R., Fagni, L. and Goldberg, Y., 2015. Regulation of postsynaptic function by the dementia-related ESCRT-III subunit CHMP2B. *J Neurosci.* 35, 3155-73. 10.1523/JNEUROSCI.0586-14.2015.
- Chattopadhyay, M., Durazo, A., Sohn, S.H., Strong, C.D., Gralla, E.B., Whitelegge, J.P. and Valentine, J.S., 2008. Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 18663-8. 10.1073/pnas.0807058105.
- Cheah, B.C., Vucic, S., Krishnan, A.V. and Kiernan, M.C., 2010. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Med Chem.* 17, 1942-199.
- Chen-Plotkin, A.S., Unger, T.L., Gallagher, M.D., Bill, E., Kwong, L.K., Volpicelli-Daley, L., Busch, J.I., Akle, S., Grossman, M., Van Deerlin, V., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M., 2012. TMEM106B, the risk gene for frontotemporal dementia, is regulated by the microRNA-132/212 cluster and affects progranulin pathways. *J Neurosci.* 32, 11213-27. 10.1523/JNEUROSCI.0521-12.2012.

- Chen, D., Fan, W., Lu, Y., Ding, X., Chen, S. and Zhong, Q., 2012. A mammalian autophagosome maturation mechanism mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 conjugate. *Mol Cell*. 45, 629-41. 10.1016/j.molcel.2011.12.036.
- Chen, F., Dong, R.R., Zhong, K.L., Ghosh, A., Tang, S.S., Long, Y., Hu, M., Miao, M.X., Liao, J.M., Sun, H.B., Kong, L.Y. and Hong, H., 2016. Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid-beta across the blood-brain barrier and memory impairment in db/db mice. *Neuropharmacology*. 101, 123-36. 10.1016/j.neuropharm.2015.07.023.
- Chen, S., Sayana, P., Zhang, X. and Le, W., 2013. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol Neurodegener*. 8, 28. 10.1186/1750-1326-8-28.
- Chen, Y., Azad, M.B. and Gibson, S.B., 2009. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ*. 16, 1040-52. 10.1038/cdd.2009.49.
- Chen, Y., Liu, H., Guan, Y., Wang, Q., Zhou, F., Jie, L., Ju, J., Pu, L., Du, H. and Wang, X., 2015. The altered autophagy mediated by TFEB in animal and cell models of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Transl Res*. 7, 1574-87.
- Cheruiyot, A., Lee, J.A., Gao, F.B. and Ahmad, S.T., 2014. Expression of mutant CHMP2B, an ESCRT-III component involved in frontotemporal dementia, causes eye deformities due to Notch misregulation in *Drosophila*. *FASEB J*. 28, 667-75. 10.1096/fj.13-234138.
- Chiang, C.H., Grauffel, C., Wu, L.S., Kuo, P.H., Doudeva, L.G., Lim, C., Shen, C.K. and Yuan, H.S., 2016. Structural analysis of disease-related TDP-43 D169G mutation: linking enhanced stability and caspase cleavage efficiency to protein accumulation. *Sci Rep*. 6, 21581. 10.1038/srep21581.
- Chiang, H.C., Wang, L., Xie, Z., Yau, A. and Zhong, Y., 2010. PI3 kinase signaling is involved in Abeta-induced memory loss in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 7060-5. 10.1073/pnas.0909314107.
- Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P. and Dice, J.F., 1989. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*. 246, 382-5.
- Chio, A., Benzi, G., Dossena, M., Mutani, R. and Mora, G., 2005. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain*. 128, 472-6. 10.1093/brain/awh373.
- Chio, A., Calvo, A., Dossena, M., Ghiglione, P., Mutani, R. and Mora, G., 2009a. ALS in Italian professional soccer players: the risk is still present and could be soccer-specific. *Amyotroph Lateral Scler*. 10, 205-9. 10.1080/17482960902721634.
- Chio, A., Mora, G., Calvo, A., Mazzini, L., Bottacchi, E., Mutani, R. and Parals, 2009b. Epidemiology of ALS in Italy: a 10-year prospective population-based study. *Neurology*. 72, 725-31. 10.1212/01.wnl.0000343008.26874.d1.
- Chio, A., Logroscino, G., Traynor, B.J., Collins, J., Simeone, J.C., Goldstein, L.A. and White, L.A., 2013. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*. 41, 118-30. 10.1159/000351153.
- Chio, A., Mora, G., Leone, M., Mazzini, L., Cocito, D., Giordana, M.T., Bottacchi, E., Mutani, R., Piemonte and Valle d'Aosta Register for, A.L.S., 2002. Early symptom progression rate is related to ALS outcome: a prospective population-based study. *Neurology*. 59, 99-103.
- Chitiprolu, M., Jagow, C., Tremblay, V., Bondy-Chorney, E., Paris, G., Savard, A., Palidwor, G., Barry, F.A., Zinman, L., Keith, J., Rogaeva, E., Robertson, J., Lavalley-Adam, M., Woulfe, J., Couture, J.F., Cote, J. and Gibbings, D., 2018. A complex of C9ORF72 and p62 uses arginine methylation to eliminate stress granules by autophagy. *Nat Commun*. 9, 2794. 10.1038/s41467-018-05273-7.

- Chiu, I.M., Morimoto, E.T., Goodarzi, H., Liao, J.T., O'Keefe, S., Phatnani, H.P., Muratet, M., Carroll, M.C., Levy, S., Tavazoie, S., Myers, R.M. and Maniatis, T., 2013. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep.* 4, 385-401. 10.1016/j.celrep.2013.06.018.
- Chow, T.W. and Mendez, M.F., 2002. Goals in symptomatic pharmacologic management of frontotemporal lobar degeneration. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 17, 267-72. 10.1177/153331750201700504.
- Chu, T., Sun, J., Saksena, S. and Emr, S.D., 2006. New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J Cell Biol.* 175, 815-23. 10.1083/jcb.200608053.
- Ciura, S., Lattante, S., Le Ber, I., Latouche, M., Tostivint, H., Brice, A. and Kabashi, E., 2013. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 74, 180-7. 10.1002/ana.23946.
- Clayton, E.L., Milioto, C., Muralidharan, B., Norona, F.E., Edgar, J.R., Soriano, A., Jafar-Nejad, P., Rigo, F., Collinge, J. and Isaacs, A.M., 2018. Frontotemporal dementia causative CHMP2B impairs neuronal endolysosomal traffic-rescue by TMEM106B knockdown. *Brain.* 141, 3428-3442. 10.1093/brain/awy284.
- Clayton, E.L., Mancuso, R., Nielsen, T.T., Mizielinska, S., Holmes, H., Powell, N., Norona, F., Larsen, J.O., Milioto, C., Wilson, K.M., Lythgoe, M.F., Ourselin, S., Nielsen, J.E., Johannsen, P., Holm, I., Collinge, J., FreJa, Oliver, P.L., Gomez-Nicola, D. and Isaacs, A.M., 2017. Early microgliosis precedes neuronal loss and behavioural impairment in mice with a frontotemporal dementia-causing CHMP2B mutation. *Hum Mol Genet.* 26, 873-887. 10.1093/hmg/ddx003.
- Cohen, T.J., Guo, J.L., Hurtado, D.E., Kwong, L.K., Mills, I.P., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M., 2011. The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat Commun.* 2, 252. 10.1038/ncomms1255.
- Cook, K.L. and Clarke, R., 2012. Heat shock 70 kDa protein 5/glucose-regulated protein 78 "AMP"ing up autophagy. *Autophagy.* 8, 1827-9.
- Costa, J., Swash, M. and de Carvalho, M., 2012. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol.* 69, 1410-6. 10.1001/archneurol.2012.254.
- Coutinho, M.F., Prata, M.J. and Alves, S., 2012. Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol Genet Metab.* 105, 542-50. 10.1016/j.ymgme.2011.12.012.
- Cox, L.E., Ferraiuolo, L., Goodall, E.F., Heath, P.R., Higginbottom, A., Mortiboys, H., Hollinger, H.C., Hartley, J.A., Brockington, A., Burness, C.E., Morrison, K.E., Wharton, S.B., Grierson, A.J., Ince, P.G., Kirby, J. and Shaw, P.J., 2010. Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One.* 5, e9872. 10.1371/journal.pone.0009872.
- Coyle-Gilchrist, I.T., Dick, K.M., Patterson, K., Vazquez Rodriguez, P., Wehmann, E., Wilcox, A., Lansdall, C.J., Dawson, K.E., Wiggins, J., Mead, S., Brayne, C. and Rowe, J.B., 2016. Prevalence, characteristics, and survival of frontotemporal lobar degeneration syndromes. *Neurology.* 86, 1736-43. 10.1212/WNL.0000000000002638.
- Crews, L., Spencer, B., Desplats, P., Patrick, C., Paulino, A., Rockenstein, E., Hansen, L., Adame, A., Galasko, D. and Masliah, E., 2010. Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PLoS One.* 5, e9313. 10.1371/journal.pone.0009313.
- Crowther, R.A. and Goedert, M., 2000. Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *J Struct Biol.* 130, 271-9. 10.1006/jsbi.2000.4270.
- Cruchaga, C., Graff, C., Chiang, H.H., Wang, J., Hinrichs, A.L., Spiegel, N., Bertelsen, S., Mayo, K., Norton, J.B., Morris, J.C. and Goate, A., 2011. Association of TMEM106B gene polymorphism with

age at onset in granulin mutation carriers and plasma granulin protein levels. *Arch Neurol.* 68, 581-6. 10.1001/archneurol.2010.350.

Cruts, M. and Van Broeckhoven, C., 2008. Loss of progranulin function in frontotemporal lobar degeneration. *Trends Genet.* 24, 186-94. 10.1016/j.tig.2008.01.004.

Cruts, M., Gijssels, I., van der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenberghe, R., Dermaut, B., Martin, J.J., van Duijn, C., Peeters, K., Sciot, R., Santens, P., De Pooter, T., Mattheijssens, M., Van den Broeck, M., Cuijt, I., Vennekens, K., De Deyn, P.P., Kumar-Singh, S. and Van Broeckhoven, C., 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature.* 442, 920-4. 10.1038/nature05017.

Cuervo, A.M. and Dice, J.F., 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science.* 273, 501-3.

Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J. and Diehl, J.A., 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol.* 23, 7198-209.

Curtis, A.F., Masellis, M., Hsiung, G.R., Moineddin, R., Zhang, K., Au, B., Millett, G., Mackenzie, I., Rogaeva, E. and Tierney, M.C., 2017. Sex differences in the prevalence of genetic mutations in FTD and ALS: A meta-analysis. *Neurology.* 89, 1633-1642. 10.1212/WNL.0000000000004494.

Cutler, R.G., Pedersen, W.A., Camandola, S., Rothstein, J.D. and Mattson, M.P., 2002. Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 52, 448-57. 10.1002/ana.10312.

Czaplinski, A., Yen, A.A. and Appel, S.H., 2006. Amyotrophic lateral sclerosis: early predictors of prolonged survival. *J Neurol.* 253, 1428-36. 10.1007/s00415-006-0226-8.

D'Ovidio, F., Rooney, J.P.K., Visser, A.E., Manera, U., Beghi, E., Logroscino, G., Vermeulen, R.C.H., Veldink, J.H., van den Berg, L.H., Hardiman, O., Chio, A. and Euro, M.c., 2018. Association between alcohol exposure and the risk of amyotrophic lateral sclerosis in the Euro-MOTOR study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 10.1136/jnnp-2018-318559.

de Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J.D., Kaji, R., Kimura, J., Mills, K., Mitsumoto, H., Nodera, H., Shefner, J. and Swash, M., 2008. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol.* 119, 497-503. 10.1016/j.clinph.2007.09.143.

De Duve, C. and Wattiaux, R., 1966. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol.* 28, 435-92. 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251.

de Jong, S.W., Huisman, M.H., Sutedja, N.A., van der Kooij, A.J., de Visser, M., Schelhaas, H.J., Fischer, K., Veldink, J.H. and van den Berg, L.H., 2012. Smoking, alcohol consumption, and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Am J Epidemiol.* 176, 233-9. 10.1093/aje/kws015.

Deforges, S., Branchu, J., Biondi, O., Grondard, C., Pariset, C., Lecolle, S., Lopes, P., Vidal, P.P., Chanoine, C. and Charbonnier, F., 2009. Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol.* 587, 3561-72. 10.1113/jphysiol.2009.169748.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.Y., Karydas, A., Seeley, W.W., Josephs, K.A., Coppola, G., Geschwind, D.H., Wszolek, Z.K., Feldman, H., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Miller, B.L., Dickson, D.W., Boylan, K.B., Graff-Radford, N.R. and Rademakers, R., 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 72, 245-56. 10.1016/j.neuron.2011.09.011.

Deng, H., Gao, K. and Jankovic, J., 2014. The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol.* 10, 337-48. 10.1038/nrneurol.2014.78.

- Deng, H.X., Shi, Y., Furukawa, Y., Zhai, H., Fu, R., Liu, E., Gorrie, G.H., Khan, M.S., Hung, W.Y., Bigio, E.H., Lukas, T., Dal Canto, M.C., O'Halloran, T.V. and Siddique, T., 2006. Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 7142-7. 10.1073/pnas.0602046103.
- Desport, J.C., Preux, P.M., Truong, T.C., Vallat, J.M., Sautereau, D. and Couratier, P., 1999. Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. *Neurology.* 53, 1059-63.
- Desport, J.C., Preux, P.M., Truong, C.T., Courat, L., Vallat, J.M. and Couratier, P., 2000. Nutritional assessment and survival in ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 1, 91-6.
- Desport, J.C., Preux, P.M., Magy, L., Boirie, Y., Vallat, J.M., Beaufriere, B. and Couratier, P., 2001. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 74, 328-34. 10.1093/ajcn/74.3.328.
- Desseille, C., Deforges, S., Biondi, O., Houdebine, L., D'Amico, D., Lamaziere, A., Caradeuc, C., Bertho, G., Bruneteau, G., Weill, L., Bastin, J., Djouadi, F., Salachas, F., Lopes, P., Chanoine, C., Massaad, C. and Charbonnier, F., 2017. Specific Physical Exercise Improves Energetic Metabolism in the Skeletal Muscle of Amyotrophic-Lateral- Sclerosis Mice. *Front Mol Neurosci.* 10, 332. 10.3389/fnmol.2017.00332.
- Devine, M.S., Woodhouse, H., McCombe, P.A. and Henderson, R.D., 2013. The relationship between limb dominance, disease lateralization and spread of weakness in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 14, 150-1. 10.3109/17482968.2012.725416.
- Devon, R.S., Orban, P.C., Gerrow, K., Barbieri, M.A., Schwab, C., Cao, L.P., Helm, J.R., Bissada, N., Cruz-Aguado, R., Davidson, T.L., Witmer, J., Metzler, M., Lam, C.K., Tetzlaff, W., Simpson, E.M., McCaffery, J.M., El-Husseini, A.E., Leavitt, B.R. and Hayden, M.R., 2006. Als2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 9595-600. 10.1073/pnas.0510197103.
- Diehl-Schmid, J., Grimmer, T., Drzezga, A., Bornschein, S., Riemenschneider, M., Forstl, H., Schwaiger, M. and Kurz, A., 2007. Decline of cerebral glucose metabolism in frontotemporal dementia: a longitudinal 18F-FDG-PET-study. *Neurobiol Aging.* 28, 42-50. 10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.002.
- Doble, A., 1996. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology.* 47, S233-41.
- Dohi, E., Tanaka, S., Seki, T., Miyagi, T., Hide, I., Takahashi, T., Matsumoto, M. and Sakai, N., 2012. Hypoxic stress activates chaperone-mediated autophagy and modulates neuronal cell survival. *Neurochem Int.* 60, 431-42. 10.1016/j.neuint.2012.01.020.
- Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., Than, M.E., Mackenzie, I.R., Capell, A., Schmid, B., Neumann, M. and Haass, C., 2010. ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J.* 29, 2841-57. 10.1038/emboj.2010.143.
- Du, A.T., Jahng, G.H., Hayasaka, S., Kramer, J.H., Rosen, H.J., Gorno-Tempini, M.L., Rankin, K.P., Miller, B.L., Weiner, M.W. and Schuff, N., 2006. Hypoperfusion in frontotemporal dementia and Alzheimer disease by arterial spin labeling MRI. *Neurology.* 67, 1215-20. 10.1212/01.wnl.0000238163.71349.78.
- Dukes, J.D., Richardson, J.D., Simmons, R. and Whitley, P., 2008. A dominant-negative ESCRT-III protein perturbs cytokinesis and trafficking to lysosomes. *Biochem J.* 411, 233-9. 10.1042/BJ20071296.
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J.L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., Seilhean, D., Hauw, J.J., Lacomblez, L., Loeffler, J.P. and Meininger, V., 2008. Dyslipidemia is a



protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 70, 1004-9. 10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27.

Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.L., di Scala, F., Rene, F., de Tapia, M., Pradat, P.F., Lacomblez, L., Seihlan, D., Prinjha, R., Walsh, F.S., Meininger, V. and Loeffler, J.P., 2002. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 10, 358-65.

El Oussini, H., Scekic-Zahirovic, J., Vercruyssen, P., Marques, C., Dirrig-Grosch, S., Dieterle, S., Picchiarelli, G., Sinniger, J., Rouaux, C. and Dupuis, L., 2017. Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 82, 444-456. 10.1002/ana.25030.

Endo, Y., Furuta, A. and Nishino, I., 2015. Danon disease: a phenotypic expression of LAMP-2 deficiency. *Acta Neuropathol*. 129, 391-8. 10.1007/s00401-015-1385-4.

Evers, B.M., Rodriguez-Navas, C., Tesla, R.J., Prange-Kiel, J., Wasser, C.R., Yoo, K.S., McDonald, J., Cenik, B., Ravenscroft, T.A., Plattner, F., Rademakers, R., Yu, G., White, C.L., 3rd and Herz, J., 2017. Lipidomic and Transcriptomic Basis of Lysosomal Dysfunction in Progranulin Deficiency. *Cell Rep*. 20, 2565-2574. 10.1016/j.celrep.2017.08.056.

Farg, M.A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J.M., Yang, S., Atkinson, R.A., Levina, V., Halloran, M.A., Gleeson, P.A., Blair, I.P., Soo, K.Y., King, A.E. and Atkin, J.D., 2014. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet*. 23, 3579-95. 10.1093/hmg/ddu068.

Fenoglio, C., Galimberti, D., Lovati, C., Guidi, I., Gatti, A., Fogliarino, S., Tiriticco, M., Mariani, C., Forloni, G., Pettenati, C., Baron, P., Conti, G., Bresolin, N. and Scarpini, E., 2004. MCP-1 in Alzheimer's disease patients: A-2518G polymorphism and serum levels. *Neurobiol Aging*. 25, 1169-73. 10.1016/j.neurobiolaging.2003.11.008.

Ferrante, R.J., Browne, S.E., Shinobu, L.A., Bowling, A.C., Baik, M.J., MacGarvey, U., Kowall, N.W., Brown, R.H., Jr and Beal, M.F., 1997. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 69, 2064-74.

Ferrari, R., Kapogiannis, D., Huey, E.D. and Momeni, P., 2011. FTD and ALS: a tale of two diseases. *Curr Alzheimer Res*. 8, 273-94.

Filocamo, M. and Morrone, A., 2011. Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. *Hum Genomics*. 5, 156-69.

Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K. and Cecconi, F., 2007. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*. 447, 1121-5. 10.1038/nature05925.

Fischer, L.R., Igoudjil, A., Magrane, J., Li, Y., Hansen, J.M., Manfredi, G. and Glass, J.D., 2011. SOD1 targeted to the mitochondrial intermembrane space prevents motor neuropathy in the Sod1 knockout mouse. *Brain*. 134, 196-209. 10.1093/brain/awq314.

Flaherty-Craig, C., Eslinger, P., Stephens, B. and Simmons, Z., 2006. A rapid screening battery to identify frontal dysfunction in patients with ALS. *Neurology*. 67, 2070-2. 10.1212/01.wnl.0000247667.89251.43.

Flis, D.J., Dzik, K., Kaczor, J.J., Halon-Golabek, M., Antosiewicz, J., Wieckowski, M.R. and Ziolkowski, W., 2018. Swim Training Modulates Skeletal Muscle Energy Metabolism, Oxidative Stress, and Mitochondrial Cholesterol Content in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2018, 5940748. 10.1155/2018/5940748.

Flood, D.G., Reaume, A.G., Gruner, J.A., Hoffman, E.K., Hirsch, J.D., Lin, Y.G., Dorfman, K.S. and Scott, R.W., 1999. Hindlimb motor neurons require Cu/Zn superoxide dismutase for maintenance of neuromuscular junctions. *Am J Pathol*. 155, 663-72. 10.1016/S0002-9440(10)65162-0.

Fontana, F., Siva, K. and Denti, M.A., 2015. A network of RNA and protein interactions in Fronto Temporal Dementia. *Front Mol Neurosci.* 8, 9. 10.3389/fnmol.2015.00009.

Forster, D.P., Newens, A.J., Kay, D.W. and Edwardson, J.A., 1995. Risk factors in clinically diagnosed presenile dementia of the Alzheimer type: a case-control study in northern England. *J Epidemiol Community Health.* 49, 253-8.

Fouillet, A., Levet, C., Virgone, A., Robin, M., Dourlen, P., Rieusset, J., Belaidi, E., Ovize, M., Touret, M., Nataf, S. and Mollereau, B., 2012. ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy.* 8, 915-26. 10.4161/auto.19716.

Freischmidt, A., Wieland, T., Richter, B., Ruf, W., Schaeffer, V., Muller, K., Marroquin, N., Nordin, F., Hubers, A., Weydt, P., Pinto, S., Press, R., Millecamps, S., Molko, N., Bernard, E., Desnuelle, C., Soriani, M.H., Dorst, J., Graf, E., Nordstrom, U., Feiler, M.S., Putz, S., Boeckers, T.M., Meyer, T., Winkler, A.S., Winkelmann, J., de Carvalho, M., Thal, D.R., Otto, M., Brannstrom, T., Volk, A.E., Kursula, P., Danzer, K.M., Lichtner, P., Dikic, I., Meitinger, T., Ludolph, A.C., Strom, T.M., Andersen, P.M. and Weishaupt, J.H., 2015. Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci.* 18, 631-6. 10.1038/nn.4000.

Frisancho, A.R., 1981. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr.* 34, 2540-5. 10.1093/ajcn/34.11.2540.

Frisoni, G.B., Beltramello, A., Geroldi, C., Weiss, C., Bianchetti, A. and Trabucchi, M., 1996. Brain atrophy in frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 61, 157-65.

Fu, M.M., Nirschl, J.J. and Holzbaur, E.L.F., 2014. LC3 binding to the scaffolding protein JIP1 regulates processive dynein-driven transport of autophagosomes. *Dev Cell.* 29, 577-590. 10.1016/j.devcel.2014.04.015.

Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T. and Yoshimori, T., 2008. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell.* 19, 2092-100. 10.1091/mbc.E07-12-1257.

Funalot, B., Desport, J.C., Sturtz, F., Camu, W. and Couratier, P., 2009. High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 10, 113-7. 10.1080/17482960802295192.

Furby, A., Beauvais, K., Kolev, I., Rivain, J.G. and Sebille, V., 2010. Rural environment and risk factors of amyotrophic lateral sclerosis: a case-control study. *J Neurol.* 257, 792-8. 10.1007/s00415-009-5419-5.

Gallia, G.L., Johnson, E.M. and Khalili, K., 2000. Puralpha: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 28, 3197-205.

Gallo, V., Bueno-De-Mesquita, H.B., Vermeulen, R., Andersen, P.M., Kyrozi, A., Linseisen, J., Kaaks, R., Allen, N.E., Roddam, A.W., Boshuizen, H.C., Peeters, P.H., Palli, D., Mattiello, A., Sieri, S., Tumino, R., Jimenez-Martin, J.M., Diaz, M.J., Suarez, L.R., Trichopoulou, A., Agudo, A., Arriola, L., Barricante-Gurrea, A., Bingham, S., Khaw, K.T., Manjer, J., Lindkvist, B., Overvad, K., Bach, F.W., Tjonneland, A., Olsen, A., Bergmann, M.M., Boeing, H., Clavel-Chapelon, F., Lund, E., Hallmans, G., Middleton, L., Vineis, P. and Riboli, E., 2009. Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: analysis of the EPIC cohort. *Ann Neurol.* 65, 378-85. 10.1002/ana.21653.

Ganley, I.G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S. and Jiang, X., 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem.* 284, 12297-305. 10.1074/jbc.M900573200.

Gao, J., Langemeyer, L., Kummel, D., Reggiori, F. and Ungermann, C., 2018. Molecular mechanism to target the endosomal Mon1-Ccz1 GEF complex to the pre-autophagosomal structure. *Elife.* 7, 10.7554/eLife.31145.

Garnier, L., Wills, J.W., Verderame, M.F. and Sudol, M., 1996. WW domains and retrovirus budding. *Nature*. 381, 744-5. 10.1038/381744a0.

Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszyka, D.G. and Sundquist, W.L., 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*. 107, 55-65.

Gascon, E., Lynch, K., Ruan, H., Almeida, S., Verheyden, J.M., Seeley, W.W., Dickson, D.W., Petrucelli, L., Sun, D., Jiao, J., Zhou, H., Jakovcevski, M., Akbarian, S., Yao, W.D. and Gao, F.B., 2014. Alterations in microRNA-124 and AMPA receptors contribute to social behavioral deficits in frontotemporal dementia. *Nat Med*. 20, 1444-51. 10.1038/nm.3717.

Gass, J., Cannon, A., Mackenzie, I.R., Boeve, B., Baker, M., Adamson, J., Crook, R., Melquist, S., Kuntz, K., Petersen, R., Josephs, K., Pickering-Brown, S.M., Graff-Radford, N., Uitti, R., Dickson, D., Wszolek, Z., Gonzalez, J., Beach, T.G., Bigio, E., Johnson, N., Weintraub, S., Mesulam, M., White, C.L., 3rd, Woodruff, B., Caselli, R., Hsiung, G.Y., Feldman, H., Knopman, D., Hutton, M. and Rademakers, R., 2006. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet*. 15, 2988-3001. 10.1093/hmg/ddl241.

Geevasinga, N., Menon, P., Scherman, D.B., Simon, N., Yiannikas, C., Henderson, R.D., Kiernan, M.C. and Vucic, S., 2016. Diagnostic criteria in amyotrophic lateral sclerosis: A multicenter prospective study. *Neurology*. 87, 684-90. 10.1212/WNL.0000000000002988.

Gendron, T.F., Chew, J., Stankowski, J.N., Hayes, L.R., Zhang, Y.J., Prudencio, M., Carlomagno, Y., Daugherty, L.M., Jansen-West, K., Perkerson, E.A., O'Raw, A., Cook, C., Pregent, L., Belzil, V., van Blitterswijk, M., Tabassian, L.J., Lee, C.W., Yue, M., Tong, J., Song, Y., Castanedes-Casey, M., Rousseau, L., Phillips, V., Dickson, D.W., Rademakers, R., Fryer, J.D., Rush, B.K., Pedraza, O., Caputo, A.M., Desaro, P., Palmucci, C., Robertson, A., Heckman, M.G., Diehl, N.N., Wiggs, E., Tierney, M., Braun, L., Farren, J., Lacomis, D., Ladha, S., Fournier, C.N., McCluskey, L.F., Elman, L.B., Toledo, J.B., McBride, J.D., Tiloca, C., Morelli, C., Poletti, B., Solca, F., Prella, A., Wu, J., Jockel-Balsarotti, J., Rigo, F., Ambrose, C., Datta, A., Yang, W., Raitcheva, D., Antognetti, G., McCampbell, A., Van Swieten, J.C., Miller, B.L., Boxer, A.L., Brown, R.H., Bowser, R., Miller, T.M., Trojanowski, J.Q., Grossman, M., Berry, J.D., Hu, W.T., Ratti, A., Traynor, B.J., Disney, M.D., Benatar, M., Silani, V., Glass, J.D., Floeter, M.K., Rothstein, J.D., Boylan, K.B. and Petrucelli, L., 2017. Poly(GP) proteins are a useful pharmacodynamic marker for C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med*. 9, 10.1126/scitranslmed.aai7866.

Ghanim, M., Guillot-Noel, L., Pasquier, F., Jornea, L., Deramecourt, V., Dubois, B., Le Ber, I., Brice, A., French Research Network on, F.T.D. and Ftd/Mnd, 2010. CHMP2B mutations are rare in French families with frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol*. 257, 2032-6. 10.1007/s00415-010-5655-8.

Ghazi-Noori, S., Froud, K.E., Mizielinska, S., Powell, C., Smidak, M., Fernandez de Marco, M., O'Malley, C., Farmer, M., Parkinson, N., Fisher, E.M., Asante, E.A., Brandner, S., Collinge, J. and Isaacs, A.M., 2012. Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain*. 135, 819-32. 10.1093/brain/aws006.

Ghoshal, N., Dearborn, J.T., Wozniak, D.F. and Cairns, N.J., 2012. Core features of frontotemporal dementia recapitulated in progranulin knockout mice. *Neurobiol Dis*. 45, 395-408. 10.1016/j.nbd.2011.08.029.

Gijssels, I., Van Langenhove, T., van der Zee, J., Slegers, K., Philtjens, S., Kleinberger, G., Janssens, J., Bettens, K., Van Cauwenberghe, C., Pereson, S., Engelborghs, S., Sieben, A., De Jonghe, P., Vandenberghe, R., Santens, P., De Bleecker, J., Maes, G., Baumer, V., Dillen, L., Joris, G., Cuijt, I., Corsmit, E., Elinck, E., Van Dongen, J., Vermeulen, S., Van den Broeck, M., Vaerenberg, C., Mattheijssens, M., Peeters, K., Robberecht, W., Cras, P., Martin, J.J., De Deyn, P.P., Cruts, M. and Van Broeckhoven, C., 2012. A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol*. 11, 54-65. 10.1016/S1474-4422(11)70261-7.

- Gill, D.J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Emr, S.D. and Williams, R.L., 2007. Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.* 26, 600-12. 10.1038/sj.emboj.7601501.
- Gille, B., De Schaepdryver, M., Goossens, J., Dedeene, L., De Vocht, J., Oldoni, E., Goris, A., Van Den Bosch, L., Depreitere, B., Claeys, K.G., Tournoy, J., Van Damme, P. and Poesen, K., 2018. Serum neurofilament light chain levels as a marker of upper motor neuron degeneration in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 10.1111/nan.12511.
- Goedert, M. and Jakes, R., 1990. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9, 4225-30.
- Golimstok, A., Campora, N., Rojas, J.I., Fernandez, M.C., Elizondo, C., Soriano, E. and Cristiano, E., 2014. Cardiovascular risk factors and frontotemporal dementia: a case-control study. *Transl Neurodegener.* 3, 13. 10.1186/2047-9158-3-13.
- Goode, A., Butler, K., Long, J., Cavey, J., Scott, D., Shaw, B., Sollenberger, J., Gell, C., Johansen, T., Oldham, N.J., Searle, M.S. and Layfield, R., 2016. Defective recognition of LC3B by mutant SQSTM1/p62 implicates impairment of autophagy as a pathogenic mechanism in ALS-FTLD. *Autophagy.* 12, 1094-104. 10.1080/15548627.2016.1170257.
- Gorno-Tempini, M.L., Dronkers, N.F., Rankin, K.P., Ogar, J.M., Phengrasamy, L., Rosen, H.J., Johnson, J.K., Weiner, M.W. and Miller, B.L., 2004. Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol.* 55, 335-46. 10.1002/ana.10825.
- Gorno-Tempini, M.L., Brambati, S.M., Ginex, V., Ogar, J., Dronkers, N.F., Marcone, A., Perani, D., Garibotto, V., Cappa, S.F. and Miller, B.L., 2008. The logopenic/phonological variant of primary progressive aphasia. *Neurology.* 71, 1227-34. 10.1212/01.wnl.0000320506.79811.da.
- Grad, L.I., Guest, W.C., Yanai, A., Pokrishevsky, E., O'Neill, M.A., Gibbs, E., Semchenko, V., Yousefi, M., Wishart, D.S., Plotkin, S.S. and Cashman, N.R., 2011. Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 16398-403. 10.1073/pnas.1102645108.
- Greenwood, D.I., 2013. Nutrition management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nutr Clin Pract.* 28, 392-9. 10.1177/0884533613476554.
- Groeneveld, G.J., Van Kan, H.J., Kalmijn, S., Veldink, J.H., Guchelaar, H.J., Wokke, J.H. and Van den Berg, L.H., 2003. Riluzole serum concentrations in patients with ALS: associations with side effects and symptoms. *Neurology.* 61, 1141-3.
- Grossman, A.B., Woolley-Levine, S., Bradley, W.G. and Miller, R.G., 2007. Detecting neurobehavioral changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 8, 56-61. 10.1080/17482960601044106.
- Group, T.S.M.N.D.R., 1992. The Scottish Motor Neuron Disease Register: a prospective study of adult onset motor neuron disease in Scotland. Methodology, demography and clinical features of incident cases in 1989. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 55, 536-41.
- Group, T.W.G.o.b.o.t.E.M.-A.S., 2017. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 16, 505-512. 10.1016/S1474-4422(17)30115-1.
- Grumati, P. and Bonaldo, P., 2012. Autophagy in skeletal muscle homeostasis and in muscular dystrophies. *Cells.* 1, 325-45. 10.3390/cells1030325.
- Grundstrom, E., Lindholm, D., Johansson, A., Blennow, K. and Askmark, H., 2000. GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport.* 11, 1781-3.

- Gu, W., Wan, D., Qian, Q., Yi, B., He, Z., Gu, Y., Wang, L. and He, S., 2014. Ambra1 is an essential regulator of autophagy and apoptosis in SW620 cells: pro-survival role of Ambra1. *PLoS One*. 9, e90151. 10.1371/journal.pone.0090151.
- Guizetti, J., Schermelleh, L., Mantler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Muller-Reichert, T. and Gerlich, D.W., 2011. Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science*. 331, 1616-20. 10.1126/science.1201847.
- Guo, Z., Li, Q., Han, Y., Liang, Y., Xu, Z. and Ren, T., 2012. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by progranulin. *Mediators Inflamm*. 2012, 540794. 10.1155/2012/540794.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X. and et al., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 264, 1772-5.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I. and Deretic, V., 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*. 119, 753-66. 10.1016/j.cell.2004.11.038.
- Hadano, S., Benn, S.C., Kakuta, S., Otomo, A., Sudo, K., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Mizumura, H., Shefner, J.M., Cox, G.A., Iwakura, Y., Brown, R.H., Jr. and Ikeda, J.E., 2006. Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet*. 15, 233-50. 10.1093/hmg/ddi440.
- Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K. and Lippincott-Schwartz, J., 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*. 141, 656-67. 10.1016/j.cell.2010.04.009.
- Hallmann, A.L., Arauzo-Bravo, M.J., Mavrommatis, L., Ehrlich, M., Ropke, A., Brockhaus, J., Missler, M., Sternecker, J., Scholer, H.R., Kuhlmann, T., Zaehres, H. and Hargus, G., 2017. Astrocyte pathology in a human neural stem cell model of frontotemporal dementia caused by mutant TAU protein. *Sci Rep*. 7, 42991. 10.1038/srep42991.
- Han, J.H., Ryu, H.H., Jun, M.H., Jang, D.J. and Lee, J.A., 2012. The functional analysis of the CHMP2B missense mutation associated with neurodegenerative diseases in the endo-lysosomal pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 421, 544-9. 10.1016/j.bbrc.2012.04.041.
- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F. and Ohsumi, Y., 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem*. 282, 37298-302. 10.1074/jbc.C700195200.
- Hara-Kuge, S. and Fujiki, Y., 2008. The peroxin Pex14p is involved in LC3-dependent degradation of mammalian peroxisomes. *Exp Cell Res*. 314, 3531-41. 10.1016/j.yexcr.2008.09.015.
- Harding, S.R., Bocchetta, M., Gordon, E., Cash, D.M., Cardoso, M.J., Druyeh, R., Ourselin, S., Warren, J.D., Mead, S. and Rohrer, J.D., 2017. The TMEM106B risk allele is associated with lower cortical volumes in a clinically diagnosed frontotemporal dementia cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 88, 997-998. 10.1136/jnnp-2017-315641.
- Harper, L., Fumagalli, G.G., Barkhof, F., Scheltens, P., O'Brien, J.T., Bouwman, F., Burton, E.J., Rohrer, J.D., Fox, N.C., Ridgway, G.R. and Schott, J.M., 2016. MRI visual rating scales in the diagnosis of dementia: evaluation in 184 post-mortem confirmed cases. *Brain*. 139, 1211-25. 10.1093/brain/aww005.
- Harris, K.M., Jensen, F.E. and Tsao, B., 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*. 12, 2685-705.

- Haugabook, S.J., Le, T., Yager, D., Zenk, B., Healy, B.M., Eckman, E.A., Prada, C., Younkin, L., Murphy, P., Pinnix, I., Onstead, L., Sambamurti, K., Golde, T.E., Dickson, D., Younkin, S.G. and Eckman, C.B., 2001. Reduction of A $\beta$  accumulation in the Tg2576 animal model of Alzheimer's disease after oral administration of the phosphatidyl-inositol kinase inhibitor wortmannin. *FASEB J.* 15, 16-18. 10.1096/fj.00-0528fje.
- Haverkamp, L.J., Appel, V. and Appel, S.H., 1995. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain.* 118 ( Pt 3), 707-19.
- He, Y. and Smith, R., 2009. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell Mol Life Sci.* 66, 1239-56. 10.1007/s00018-008-8532-1.
- He, Z., Ong, C.H., Halper, J. and Bateman, A., 2003. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med.* 9, 225-9. 10.1038/nm816.
- Hegedus, J., Putman, C.T. and Gordon, T., 2007. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 28, 154-64. 10.1016/j.nbd.2007.07.003.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J. and Emr, S.D., 2011. The ESCRT pathway. *Dev Cell.* 21, 77-91. 10.1016/j.devcel.2011.05.015.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Zhao, Y. and Emr, S.D., 2012. The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell.* 151, 356-71. 10.1016/j.cell.2012.08.039.
- Heo, J.M., Ordureau, A., Paulo, J.A., Rinehart, J. and Harper, J.W., 2015. The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Mol Cell.* 60, 7-20. 10.1016/j.molcel.2015.08.016.
- Herda, S., Raczkowski, F., Mittrucker, H.W., Willimsky, G., Gerlach, K., Kuhl, A.A., Breiderhoff, T., Willnow, T.E., Dorken, B., Hopken, U.E. and Rehm, A., 2012. The sorting receptor Sortilin exhibits a dual function in exocytic trafficking of interferon-gamma and granzyme A in T cells. *Immunity.* 37, 854-66. 10.1016/j.immuni.2012.07.012.
- Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A.M., Brown, R.H. and Glimcher, L.H., 2009. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 23, 2294-306. 10.1101/gad.1830709.
- Hewitt, G., Carroll, B., Sarallah, R., Correia-Melo, C., Ogrodnik, M., Nelson, G., Otten, E.G., Manni, D., Antrobus, R., Morgan, B.A., von Zglinicki, T., Jurk, D., Seluanov, A., Gorbunova, V., Johansen, T., Passos, J.F. and Korolchuk, V.I., 2016. SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy.* 12, 1917-1930. 10.1080/15548627.2016.1210368.
- Higashi, Y., Jitsuiki, D., Chayama, K. and Yoshizumi, M., 2006. Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), a novel free radical scavenger, for treatment of cardiovascular diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 1, 85-93.
- Higelin, J., Demestre, M., Putz, S., Delling, J.P., Jacob, C., Lutz, A.K., Bausinger, J., Huber, A.K., Klingenstein, M., Barbi, G., Speit, G., Huebers, A., Weishaupt, J.H., Hermann, A., Liebau, S., Ludolph, A.C. and Boeckers, T.M., 2016. FUS Mislocalization and Vulnerability to DNA Damage in ALS Patients Derived hiPSCs and Aging Motoneurons. *Front Cell Neurosci.* 10, 290. 10.3389/fncel.2016.00290.
- Hjerpe, R., Bett, J.S., Keuss, M.J., Solovyova, A., McWilliams, T.G., Johnson, C., Sahu, I., Varghese, J., Wood, N., Wightman, M., Osborne, G., Bates, G.P., Glickman, M.H., Trost, M., Knebel, A., Marchesi, F. and Kurz, T., 2016. UBQLN2 Mediates Autophagy-Independent Protein Aggregate Clearance by the Proteasome. *Cell.* 166, 935-949. 10.1016/j.cell.2016.07.001.

- Hodges, J.R., Davies, R., Xuereb, J., Kril, J. and Halliday, G., 2003. Survival in frontotemporal dementia. *Neurology*. 61, 349-54.
- Hogan, D.B., Jette, N., Fiest, K.M., Roberts, J.I., Pearson, D., Smith, E.E., Roach, P., Kirk, A., Pringsheim, T. and Maxwell, C.J., 2016. The Prevalence and Incidence of Frontotemporal Dementia: a Systematic Review. *Can J Neurol Sci*. 43 Suppl 1, S96-S109. 10.1017/cjn.2016.25.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.L., Oshiro, N. and Mizushima, N., 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 20, 1981-91. 10.1091/mbc.E08-12-1248.
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L.A. and Rabinowich, H., 2010. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy*. 6, 891-900. 10.4161/auto.6.7.13038.
- Houi, K., Kobayashi, T., Kato, S., Mochio, S. and Inoue, K., 2002. Increased plasma TGF-beta1 in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 106, 299-301.
- Hu, H. and Sun, S.C., 2016. Ubiquitin signaling in immune responses. *Cell Res*. 26, 457-83. 10.1038/cr.2016.40.
- Huisman, M.H., Seelen, M., de Jong, S.W., Dorresteyn, K.R., van Doormaal, P.T., van der Kooij, A.J., de Visser, M., Schelhaas, H.J., van den Berg, L.H. and Veldink, J.H., 2013. Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 84, 976-81. 10.1136/jnnp-2012-304724.
- Huisman, M.H., Seelen, M., van Doormaal, P.T., de Jong, S.W., de Vries, J.H., van der Kooij, A.J., de Visser, M., Schelhaas, H.J., van den Berg, L.H. and Veldink, J.H., 2015. Effect of Presymptomatic Body Mass Index and Consumption of Fat and Alcohol on Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 72, 1155-62. 10.1001/jamaneurol.2015.1584.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. and Heutink, P., 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 393, 702-5. 10.1038/31508.
- Hwang, C.S., Liu, G.T., Chang, M.D., Liao, I.L. and Chang, H.T., 2013. Elevated serum autoantibody against high mobility group box 1 as a potent surrogate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 58, 13-8. 10.1016/j.nbd.2013.04.013.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T. and Ohsumi, Y., 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 408, 488-92. 10.1038/35044114.
- Ikejima, C., Yasuno, F., Mizukami, K., Sasaki, M., Tanimukai, S. and Asada, T., 2009. Prevalence and causes of early-onset dementia in Japan: a population-based study. *Stroke*. 40, 2709-14. 10.1161/STROKEAHA.108.542308.
- Iko, Y., Kodama, T.S., Kasai, N., Oyama, T., Morita, E.H., Muto, T., Okumura, M., Fujii, R., Takumi, T., Tate, S. and Morikawa, K., 2004. Domain architectures and characterization of an RNA-binding protein, TLS. *J Biol Chem*. 279, 44834-40. 10.1074/jbc.M408552200.
- Ilzecka, J., Stelmasiak, Z. and Dobosz, B., 2002. Transforming growth factor-Beta 1 (tgf-Beta 1) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine*. 20, 239-43.

- Ilzecka, J., Stelmasiak, Z., Solski, J., Wawrzycki, S. and Szpetnar, M., 2003. Plasma amino acids concentration in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amino Acids*. 25, 69-73. 10.1007/s00726-002-0352-2.
- Infante, R.E., Wang, M.L., Radhakrishnan, A., Kwon, H.J., Brown, M.S. and Goldstein, J.L., 2008. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 15287-92. 10.1073/pnas.0807328105.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. and Guan, K.L., 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 4, 648-57. 10.1038/ncb839.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C. and Mizushima, N., 2012. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*. 151, 1256-69. 10.1016/j.cell.2012.11.001.
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K. and Mizushima, N., 2008. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell*. 19, 5360-72. 10.1091/mbc.E08-01-0080.
- Ito, Y., Yamada, M., Tanaka, H., Aida, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H. and Hara, H., 2009. Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol Dis*. 36, 470-6. 10.1016/j.nbd.2009.08.013.
- Jahreiss, L., Menzies, F.M. and Rubinsztein, D.C., 2008. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic*. 9, 574-87. 10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x.
- Jang, Y.C., Lustgarten, M.S., Liu, Y., Muller, F.L., Bhattacharya, A., Liang, H., Salmon, A.B., Brooks, S.V., Larkin, L., Hayworth, C.R., Richardson, A. and Van Remmen, H., 2010. Increased superoxide in vivo accelerates age-associated muscle atrophy through mitochondrial dysfunction and neuromuscular junction degeneration. *FASEB J*. 24, 1376-90. 10.1096/fj.09-146308.
- Jiang, C., Lin, W.J., Sadahiro, M., Labonte, B., Menard, C., Pfau, M.L., Tamminga, C.A., Turecki, G., Nestler, E.J., Russo, S.J. and Salton, S.R., 2017. VGF function in depression and antidepressant efficacy. *Mol Psychiatry*. 10.1038/mp.2017.233.
- Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T. and Mizushima, N., 2014. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol Biol Cell*. 25, 1327-37. 10.1091/mbc.E13-08-0447.
- Jimenez-Orgaz, A., Kvainickas, A., Nagele, H., Denner, J., Eimer, S., Dengjel, J. and Steinberg, F., 2018. Control of RAB7 activity and localization through the retromer-TBC1D5 complex enables RAB7-dependent mitophagy. *EMBO J*. 37, 235-254. 10.15252/embj.201797128.
- Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V.C., Lill, J.R. and Ashkenazi, A., 2009. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell*. 137, 721-35. 10.1016/j.cell.2009.03.015.
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V.M. and Neefjes, J., 2007. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin. *J Cell Biol*. 176, 459-71. 10.1083/jcb.200606077.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M. and Kim, D.H., 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. 20, 1992-2003. 10.1091/mbc.E08-12-1249.
- Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Vande Velde, C., Bouchard, J.P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P.F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N.



- and Rouleau, G.A., 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 40, 572-4. 10.1038/ng.132.
- Kalkonde, Y.V., Jawaid, A., Qureshi, S.U., Shirani, P., Wheaton, M., Pinto-Patarroyo, G.P. and Schulz, P.E., 2012. Medical and environmental risk factors associated with frontotemporal dementia: a case-control study in a veteran population. *Alzheimers Dement.* 8, 204-10. 10.1016/j.jalz.2011.03.011.
- Kamel, F., Umbach, D.M., Hu, H., Munsat, T.L., Shefner, J.M., Taylor, J.A. and Sandler, D.P., 2005. Lead exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2, 195-201. 10.1159/000089625.
- Kamogawa, E. and Sueishi, Y., 2014. A multiple free-radical scavenging (MULTIS) study on the antioxidant capacity of a neuroprotective drug, edaravone as compared with uric acid, glutathione, and trolox. *Bioorg Med Chem Lett.* 24, 1376-9. 10.1016/j.bmcl.2014.01.045.
- Kaneb, H.M., Sharp, P.S., Rahmani-Kondori, N. and Wells, D.J., 2011. Metformin treatment has no beneficial effect in a dose-response survival study in the SOD1(G93A) mouse model of ALS and is harmful in female mice. *PLoS One.* 6, e24189. 10.1371/journal.pone.0024189.
- Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M. and Klionsky, D.J., 2009a. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell.* 17, 98-109. 10.1016/j.devcel.2009.06.014.
- Kanki, T., Wang, K., Baba, M., Bartholomew, C.R., Lynch-Day, M.A., Du, Z., Geng, J., Mao, K., Yang, Z., Yen, W.L. and Klionsky, D.J., 2009b. A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Mol Biol Cell.* 20, 4730-8. 10.1091/mbc.E09-03-0225.
- Katzmann, D.J., Babst, M. and Emr, S.D., 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell.* 106, 145-55.
- Kertesz, A., Morlog, D., Light, M., Blair, M., Davidson, W., Jesso, S. and Brashear, R., 2008. Galantamine in frontotemporal dementia and primary progressive aphasia. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 25, 178-85. 10.1159/000113034.
- Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R. and Zoing, M.C., 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet.* 377, 942-55. 10.1016/S0140-6736(10)61156-7.
- Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E. and Cuervo, A.M., 2004. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell.* 15, 4829-40. 10.1091/mbc.e04-06-0477.
- Kikuchi, K., Kawahara, K., Tancharoen, S., Matsuda, F., Morimoto, Y., Ito, T., Biswas, K.K., Takenouchi, K., Miura, N., Oyama, Y., Nawa, Y., Arimura, N., Iwata, M., Tajima, Y., Kuramoto, T., Nakayama, K., Shigemori, M., Yoshida, Y., Hashiguchi, T. and Maruyama, I., 2009. The free radical scavenger edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-mobility group box-1 in neuronal cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 329, 865-74. 10.1124/jpet.108.149484.
- Kim, B.W., Kwon, D.H. and Song, H.K., 2016. Structure biology of selective autophagy receptors. *BMB Rep.* 49, 73-80.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. and Guan, K.L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 13, 132-41. 10.1038/ncb2152.
- Kim, P.K., Hailey, D.W., Mullen, R.T. and Lippincott-Schwartz, J., 2008. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 20567-74. 10.1073/pnas.0810611105.
- Kim, S.H., Engelhardt, J.I., Henkel, J.S., Siklos, L., Soos, J., Goodman, C. and Appel, S.H., 2004. Widespread increased expression of the DNA repair enzyme PARP in brain in ALS. *Neurology.* 62, 319-22.

- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T. and Ohsumi, Y., 1999. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol.* 147, 435-46.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. and Ohsumi, Y., 2000. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol.* 151, 263-76.
- Kirkinezos, I.G., Hernandez, D., Bradley, W.G. and Moraes, C.T., 2003. Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 53, 804-7. 10.1002/ana.10597.
- Kishino, A., Hayashi, K., Hidai, C., Masuda, T., Nomura, Y. and Oshima, T., 2017. XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells. *Sci Rep.* 7, 4442. 10.1038/s41598-017-02960-1.
- Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L.A., Boulting, G.L., Moccia, R., Wainger, B.J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., Mellin, C., Merkle, F.T., Davis-Dusenbery, B.N., Ziller, M., Oakley, D., Ichida, J., Di Costanzo, S., Atwater, N., Maeder, M.L., Goodwin, M.J., Nemes, J., Handsaker, R.E., Paull, D., Noggle, S., McCarroll, S.A., Joung, J.K., Woolf, C.J., Brown, R.H. and Eggan, K., 2014. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell.* 14, 781-95. 10.1016/j.stem.2014.03.004.
- Klein, Z.A., Takahashi, H., Ma, M., Stagi, M., Zhou, M., Lam, T.T. and Strittmatter, S.M., 2017. Loss of TMEM106B Ameliorates Lysosomal and Frontotemporal Dementia-Related Phenotypes in Progranulin-Deficient Mice. *Neuron.* 95, 281-296 e6. 10.1016/j.neuron.2017.06.026.
- Kleinberger, G., Brendel, M., Mracsko, E., Wefers, B., Groeneweg, L., Xiang, X., Focke, C., Deussing, M., Suarez-Calvet, M., Mazaheri, F., Parhizkar, S., Pettkus, N., Wurst, W., Feederle, R., Bartenstein, P., Mueggler, T., Arzberger, T., Knuesel, I., Rominger, A. and Haass, C., 2017. The FTD-like syndrome causing TREM2 T66M mutation impairs microglia function, brain perfusion, and glucose metabolism. *EMBO J.* 36, 1837-1853. 10.15252/embj.201796516.
- Knopman, D.S. and Roberts, R.O., 2011. Estimating the number of persons with frontotemporal lobar degeneration in the US population. *J Mol Neurosci.* 45, 330-5. 10.1007/s12031-011-9538-y.
- Knopman, D.S., Petersen, R.C., Edland, S.D., Cha, R.H. and Rocca, W.A., 2004. The incidence of frontotemporal lobar degeneration in Rochester, Minnesota, 1990 through 1994. *Neurology.* 62, 506-8.
- Kochl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y. and Tooze, S.A., 2006. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic.* 7, 129-45. 10.1111/j.1600-0854.2005.00368.x.
- Kohen, R. and Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30, 620-50. 10.1080/01926230290166724.
- Kortte, K.B. and Rogalski, E.J., 2013. Behavioural interventions for enhancing life participation in behavioural variant frontotemporal dementia and primary progressive aphasia. *Int Rev Psychiatry.* 25, 237-45. 10.3109/09540261.2012.751017.
- Kostrominova, T.Y., 2010. Advanced age-related denervation and fiber-type grouping in skeletal muscle of SOD1 knockout mice. *Free Radic Biol Med.* 49, 1582-93. 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.022.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E. and Momoi, T., 2007. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 14, 230-9. 10.1038/sj.cdd.4401984.

- Krabbe, G., Minami, S.S., Etcheagaray, J.I., Taneja, P., Djukic, B., Davalos, D., Le, D., Lo, I., Zhan, L., Reichert, M.C., Sayed, F., Merlini, M., Ward, M.E., Perry, D.C., Lee, S.E., Sias, A., Parkhurst, C.N., Gan, W.B., Akassoglou, K., Miller, B.L., Farese, R.V., Jr. and Gan, L., 2017. Microglial NFKappaB-TNFalpha hyperactivation induces obsessive-compulsive behavior in mouse models of progranulin-deficient frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114, 5029-5034. 10.1073/pnas.1700477114.
- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., Beckers, L., O'Loughlin, E., Xu, Y., Fanek, Z., Greco, D.J., Smith, S.T., Tweet, G., Humulock, Z., Zrzavy, T., Conde-Sanroman, P., Gacias, M., Weng, Z., Chen, H., Tjon, E., Mazaheri, F., Hartmann, K., Madi, A., Ulrich, J.D., Glatzel, M., Worthmann, A., Heeren, J., Budnik, B., Lemere, C., Ikezu, T., Heppner, F.L., Litvak, V., Holtzman, D.M., Lassmann, H., Weiner, H.L., Ochando, J., Haass, C. and Butovsky, O., 2017. The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity.* 47, 566-581 e9. 10.1016/j.immuni.2017.08.008.
- Kruger, U., Wang, Y., Kumar, S. and Mandelkow, E.M., 2012. Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose. *Neurobiol Aging.* 33, 2291-305. 10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.009.
- Kuchitsu, Y., Homma, Y., Fujita, N. and Fukuda, M., 2018. Rab7 knockout unveils regulated autolysosome maturation induced by glutamine starvation. *J Cell Sci.* 131, 10.1242/jcs.215442.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N. and Ohsumi, Y., 2002. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem.* 277, 18619-25. 10.1074/jbc.M111889200.
- Kumar, A., Bala, L., Kalita, J., Misra, U.K., Singh, R.L., Khetrapal, C.L. and Babu, G.N., 2010. Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chim Acta.* 411, 563-7. 10.1016/j.cca.2010.01.016.
- Kwiatkowski, T.J., Jr., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G.A., Hosler, B.A., Cortelli, P., de Jong, P.J., Yoshinaga, Y., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Horvitz, H.R., Landers, J.E. and Brown, R.H., Jr., 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 323, 1205-8. 10.1126/science.1166066.
- Laakso, M.P., Frisoni, G.B., Kononen, M., Mikkonen, M., Beltramello, A., Geroldi, C., Bianchetti, A., Trabucchi, M., Soininen, H. and Aronen, H.J., 2000. Hippocampus and entorhinal cortex in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease: a morphometric MRI study. *Biol Psychiatry.* 47, 1056-63.
- Lapchak, P.A. and Zivin, J.A., 2009. The lipophilic multifunctional antioxidant edaravone (radicut) improves behavior following embolic strokes in rabbits: a combination therapy study with tissue plasminogen activator. *Exp Neurol.* 215, 95-100. 10.1016/j.expneurol.2008.09.004.
- Lattante, S., Conte, A., Zollino, M., Luigetti, M., Del Grande, A., Marangi, G., Romano, A., Marcaccio, A., Meleo, E., Bisogni, G., Rossini, P.M. and Sabatelli, M., 2012. Contribution of major amyotrophic lateral sclerosis genes to the etiology of sporadic disease. *Neurology.* 79, 66-72. 10.1212/WNL.0b013e31825dceca.
- Lebert, F., Stekke, W., Hasenbroekx, C. and Pasquier, F., 2004. Frontotemporal dementia: a randomised, controlled trial with trazodone. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 17, 355-9. 10.1159/000077171.
- Lee, I.H. and Finkel, T., 2009. Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *J Biol Chem.* 284, 6322-8. 10.1074/jbc.M807135200.

- Lei, K. and Davis, R.J., 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 2432-7. 10.1073/pnas.0438011100.
- Lei, Y., Iwashita, M., Choi, J., Aikawa, M. and Aikawa, E., 2015. N-acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase Suppresses Lysosomal Hydrolases in Dysfunctional Osteoclasts: A Potential Mechanism for Vascular Calcification. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2, 31-47. 10.3390/jcdd2020031.
- Lerga, A., Hallier, M., Delva, L., Orvain, C., Gallais, I., Marie, J. and Moreau-Gachelin, F., 2001. Identification of an RNA binding specificity for the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem.* 276, 6807-16. 10.1074/jbc.M008304200.
- Leroy, J.G., Sillence, D., Wood, T., Barnes, J., Lebel, R.R., Friez, M.J., Stevenson, R.E., Steet, R. and Cathey, S.S., 2014. A novel intermediate mucopolipidosis II/IIIalpha caused by GNPTAB mutation in the cytosolic N-terminal domain. *Eur J Hum Genet.* 22, 594-601. 10.1038/ejhg.2013.207.
- Leyton, C.E. and Hodges, J.R., 2010. Frontotemporal dementias: Recent advances and current controversies. *Ann Indian Acad Neurol.* 13, S74-80. 10.4103/0972-2327.74249.
- Li, L., Zhang, X. and Le, W., 2008. Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy.* 4, 290-3.
- Li, Q., Yokoshi, M., Okada, H. and Kawahara, Y., 2015. The cleavage pattern of TDP-43 determines its rate of clearance and cytotoxicity. *Nat Commun.* 6, 6183. 10.1038/ncomms7183.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.H. and Jung, J.U., 2006. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol.* 8, 688-99. 10.1038/ncb1426.
- Lindauer, E., Dupuis, L., Muller, H.P., Neumann, H., Ludolph, A.C. and Kassubek, J., 2013. Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One.* 8, e67783. 10.1371/journal.pone.0067783.
- Lindmo, K., Brech, A., Finley, K.D., Gaumer, S., Contamine, D., Rusten, T.E. and Stenmark, H., 2008. The PI 3-kinase regulator Vps15 is required for autophagic clearance of protein aggregates. *Autophagy.* 4, 500-6.
- Ling, D., Song, H.J., Garza, D., Neufeld, T.P. and Salvaterra, P.M., 2009. Abeta42-induced neurodegeneration via an age-dependent autophagic-lysosomal injury in *Drosophila*. *PLoS One.* 4, e4201. 10.1371/journal.pone.0004201.
- Ling, S.C., Polymenidou, M. and Cleveland, D.W., 2013. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron.* 79, 416-38. 10.1016/j.neuron.2013.07.033.
- Liu-Yesucevitz, L., Bilgutay, A., Zhang, Y.J., Vanderweyde, T., Citro, A., Mehta, T., Zaarur, N., McKee, A., Bowser, R., Sherman, M., Petrucelli, L. and Wolozin, B., 2010. Tau DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One.* 5, e13250. 10.1371/journal.pone.0013250.
- Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K. and Avruch, J., 2005. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol.* 15, 702-13. 10.1016/j.cub.2005.02.053.
- Lopez, A., Lee, S.E., Wojta, K., Ramos, E.M., Klein, E., Chen, J., Boxer, A.L., Gorno-Tempini, M.L., Geschwind, D.H., Schlotawa, L., Ogryzko, N.V., Bigio, E.H., Rogalski, E., Weintraub, S., Mesulam, M.M., Tauopathy Genetics, C., Fleming, A., Coppola, G., Miller, B.L. and Rubinsztein, D.C., 2017. A152T tau allele causes neurodegeneration that can be ameliorated in a zebrafish model by autophagy induction. *Brain.* 140, 1128-1146. 10.1093/brain/awx005.
- Louwerse, E.S., Visser, C.E., Bossuyt, P.M. and Weverling, G.J., 1997. Amyotrophic lateral sclerosis: mortality risk during the course of the disease and prognostic factors. The Netherlands ALS Consortium. *J Neurol Sci.* 152 Suppl 1, S10-7.

- Lu, Q., Hope, L.W., Brasch, M., Reinhard, C. and Cohen, S.N., 2003. TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 7626-31. 10.1073/pnas.0932599100.
- Lu, Y., Zhang, Z., Sun, D., Sweeney, S.T. and Gao, F.B., 2013. Syntaxin 13, a genetic modifier of mutant CHMP2B in frontotemporal dementia, is required for autophagosome maturation. *Mol Cell.* 52, 264-71. 10.1016/j.molcel.2013.08.041.
- Macomber, P.B. and Sprinz, H., 1967. Morphological effects of chloroquine on *Plasmodium berghei* in mice. *Nature.* 214, 937-9.
- Mahoney, C.J., Malone, I.B., Ridgway, G.R., Buckley, A.H., Downey, L.E., Golden, H.L., Ryan, N.S., Ourselin, S., Schott, J.M., Rossor, M.N., Fox, N.C. and Warren, J.D., 2013. White matter tract signatures of the progressive aphasia. *Neurobiol Aging.* 34, 1687-99. 10.1016/j.neurobiolaging.2012.12.002.
- Mahoney, C.J., Ridgway, G.R., Malone, I.B., Downey, L.E., Beck, J., Kinnunen, K.M., Schmitz, N., Golden, H.L., Rohrer, J.D., Schott, J.M., Rossor, M.N., Ourselin, S., Mead, S., Fox, N.C. and Warren, J.D., 2014. Profiles of white matter tract pathology in frontotemporal dementia. *Hum Brain Mapp.* 35, 4163-79. 10.1002/hbm.22468.
- Mahoney, D.J., Rodriguez, C., Devries, M., Yasuda, N. and Tarnopolsky, M.A., 2004. Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 29, 656-62. 10.1002/mus.20004.
- Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J. and Cantley, L.C., 2002. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell.* 10, 151-62.
- Mao, Y., Nickitenko, A., Duan, X., Lloyd, T.E., Wu, M.N., Bellen, H. and Quioco, F.A., 2000. Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell.* 100, 447-56.
- Martin-Serrano, J., Zang, T. and Bieniasz, P.D., 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med.* 7, 1313-9. 10.1038/nm1201-1313.
- Martin, L., Latypova, X. and Terro, F., 2011. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 58, 458-71. 10.1016/j.neuint.2010.12.023.
- Martinet, W., Knaapen, M.W., Kockx, M.M. and De Meyer, G.R., 2007. Autophagy in cardiovascular disease. *Trends Mol Med.* 13, 482-91. 10.1016/j.molmed.2007.08.004.
- Marzella, L., Ahlberg, J. and Glaumann, H., 1980. In vitro uptake of particles by lysosomes. *Exp Cell Res.* 129, 460-6.
- Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki, T., Mori, H., Kamioka, Y. and Mochizuki, N., 2006. Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J.* 25, 2889-97. 10.1038/sj.emboj.7601176.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. and White, E., 2007. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 7, 961-7. 10.1038/nrc2254.
- Mattsson, N., Insel, P.S., Palmqvist, S., Portelius, E., Zetterberg, H., Weiner, M., Blennow, K., Hansson, O. and Alzheimer's Disease Neuroimaging, I., 2016. Cerebrospinal fluid tau, neurogranin, and neurofilament light in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med.* 8, 1184-1196. 10.15252/emmm.201606540.

- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M. and Reggiori, F., 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 14, 1435-1455. 10.1080/15548627.2018.1474314.
- McAlpine, F., Williamson, L.E., Tooze, S.A. and Chan, E.Y., 2013. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy*. 9, 361-73. 10.4161/auto.23066.
- McCullough, J., Row, P.E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M.J. and Urbe, S., 2006. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol*. 16, 160-5. 10.1016/j.cub.2005.11.073.
- McEwan, D.G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., Coxon, F.P., Miranda de Stegmann, D., Bhogaraju, S., Maddi, K., Kirchof, A., Gatti, E., Helfrich, M.H., Wakatsuki, S., Behrends, C., Pierre, P. and Dikic, I., 2015. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol Cell*. 57, 39-54. 10.1016/j.molcel.2014.11.006.
- McLachlan, D.R., Bergeron, C., Smith, J.E., Boomer, D. and Rifat, S.L., 1996. Risk for neuropathologically confirmed Alzheimer's disease and residual aluminum in municipal drinking water employing weighted residential histories. *Neurology*. 46, 401-5.
- Meeter, L.H., Patzke, H., Loewen, G., Dopfer, E.G., Pijnenburg, Y.A., van Minkelen, R. and van Swieten, J.C., 2016a. Progranulin Levels in Plasma and Cerebrospinal Fluid in Granulin Mutation Carriers. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 6, 330-340. 10.1159/000447738.
- Meeter, L.H., Dopfer, E.G., Jiskoot, L.C., Sanchez-Valle, R., Graff, C., Benussi, L., Ghidoni, R., Pijnenburg, Y.A., Borroni, B., Galimberti, D., Laforce, R.J., Masellis, M., Vandenberghe, R., Ber, I.L., Otto, M., van Minkelen, R., Papma, J.M., Rombouts, S.A., Balasa, M., Oijerstedt, L., Jelic, V., Dick, K.M., Cash, D.M., Harding, S.R., Jorge Cardoso, M., Ourselin, S., Rossor, M.N., Padovani, A., Scarpini, E., Fenoglio, C., Tartaglia, M.C., Lamari, F., Barro, C., Kuhle, J., Rohrer, J.D., Teunissen, C.E. and van Swieten, J.C., 2016b. Neurofilament light chain: a biomarker for genetic frontotemporal dementia. *Ann Clin Transl Neurol*. 3, 623-36. 10.1002/acn3.325.
- Mendez, M.F., Shapira, J.S., McMurtray, A. and Licht, E., 2007. Preliminary findings: behavioral worsening on donepezil in patients with frontotemporal dementia. *Am J Geriatr Psychiatry*. 15, 84-7. 10.1097/01.JGP.0000231744.69631.33.
- Mercer, C.A., Kaliappan, A. and Dennis, P.B., 2009. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*. 5, 649-62.
- Mercy, L., Hodges, J.R., Dawson, K., Barker, R.A. and Brayne, C., 2008. Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom. *Neurology*. 71, 1496-9. 10.1212/01.wnl.0000334277.16896.fa.
- Miller, R.G., Munsat, T.L., Swash, M. and Brooks, B.R., 1999. Consensus guidelines for the design and implementation of clinical trials in ALS. World Federation of Neurology committee on Research. *J Neurol Sci*. 169, 2-12.
- Miller, R.G., Bouchard, J.P., Duquette, P., Eisen, A., Gelinas, D., Harati, Y., Munsat, T.L., Powe, L., Rothstein, J., Salzman, P. and Sufit, R.L., 1996. Clinical trials of riluzole in patients with ALS. ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology*. 47, S86-90; discussion S90-2.
- Morahan, J.M. and Pamphlett, R., 2006. Amyotrophic lateral sclerosis and exposure to environmental toxins: an Australian case-control study. *Neuroepidemiology*. 27, 130-5. 10.1159/000095552.
- Morbelli, S., Ferrara, M., Fiz, F., Dessi, B., Arnaldi, D., Picco, A., Bossert, I., Buschiazzo, A., Accardo, J., Picori, L., Girtler, N., Mandich, P., Pagani, M., Sambuceti, G. and Nobili, F., 2016. Mapping brain morphological and functional conversion patterns in predementia late-onset bvFTD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 43, 1337-47. 10.1007/s00259-016-3335-3.

- Mori, K., Weng, S.M., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., Schmid, B., Kretzschmar, H.A., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Haass, C. and Edbauer, D., 2013a. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science*. 339, 1335-8. 10.1126/science.1232927.
- Mori, K., Lammich, S., Mackenzie, I.R., Forne, I., Zilow, S., Kretzschmar, H., Edbauer, D., Janssens, J., Kleinberger, G., Cruts, M., Herms, J., Neumann, M., Van Broeckhoven, C., Arzberger, T. and Haass, C., 2013b. hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9orf72 mutations. *Acta Neuropathol.* 125, 413-23. 10.1007/s00401-013-1088-7.
- Moruno-Manchon, J.F., Koellhoffer, E.C., Gopakumar, J., Hambarde, S., Kim, N., McCullough, L.D. and Tsvetkov, A.S., 2017. The G-quadruplex DNA stabilizing drug pyridostatin promotes DNA damage and downregulates transcription of Brcal in neurons. *Aging (Albany NY)*. 9, 1957-1970. 10.18632/aging.101282.
- Moura, M.C., Novaes, M.R., Eduardo, E.J., Zago, Y.S., Freitas Rdel, N. and Casulari, L.A., 2015. Prognostic Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Population-Based Study. *PLoS One*. 10, e0141500. 10.1371/journal.pone.0141500.
- Munch, C., O'Brien, J. and Bertolotti, A., 2011. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 3548-53. 10.1073/pnas.1017275108.
- Munck Petersen, C., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobsen, L., Gliemann, J., Moestrup, S.K. and Madsen, P., 1999. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J*. 18, 595-604. 10.1093/emboj/18.3.595.
- Myung, J., Kim, K.B. and Crews, C.M., 2001. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev*. 21, 245-73.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F. and Youle, R.J., 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*. 183, 795-803. 10.1083/jcb.200809125.
- Nassif, M., Valenzuela, V., Rojas-Rivera, D., Vidal, R., Matus, S., Castillo, K., Fuentealba, Y., Kroemer, G., Levine, B. and Hetz, C., 2014. Pathogenic role of BECN1/Beclin 1 in the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy*. 10, 1256-71. 10.4161/auto.28784.
- Nau, K.L., Bromberg, M.B., Forshew, D.A. and Katch, V.L., 1995. Individuals with amyotrophic lateral sclerosis are in caloric balance despite losses in mass. *J Neurol Sci*. 129 Suppl, 47-9.
- Naumann, M., Pal, A., Goswami, A., Lojewski, X., Japtok, J., Vehlow, A., Naujock, M., Gunther, R., Jin, M., Stanslowsky, N., Reinhardt, P., Sternecker, J., Frickenhaus, M., Pan-Montojo, F., Storkebaum, E., Poser, I., Freischmidt, A., Weishaupt, J.H., Holzmann, K., Troost, D., Ludolph, A.C., Boeckers, T.M., Liebau, S., Petri, S., Cordes, N., Hyman, A.A., Wegner, F., Grill, S.W., Weis, J., Storch, A. and Hermann, A., 2018. Impaired DNA damage response signaling by FUS-NLS mutations leads to neurodegeneration and FUS aggregate formation. *Nat Commun*. 9, 335. 10.1038/s41467-017-02299-1.
- Neary, D., Snowden, J.S., Gustafson, L., Passant, U., Stuss, D., Black, S., Freedman, M., Kertesz, A., Robert, P.H., Albert, M., Boone, K., Miller, B.L., Cummings, J. and Benson, D.F., 1998. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology*. 51, 1546-54.
- Nelson, L.M., McGuire, V., Longstreth, W.T., Jr. and Matkin, C., 2000. Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. I. Cigarette smoking and alcohol consumption. *Am J Epidemiol*. 151, 156-63.
- Nemazanyy, I., Blaauw, B., Paolini, C., Caillaud, C., Protasi, F., Mueller, A., Proikas-Cezanne, T., Russell, R.C., Guan, K.L., Nishino, I., Sandri, M., Pende, M. and Panasyuk, G., 2013. Defects of Vps15 in skeletal muscles lead to autophagic vacuolar myopathy and lysosomal disease. *EMBO Mol Med*. 5, 870-90. 10.1002/emmm.201202057.

- Nicholson, A.M., Finch, N.A., Wojtas, A., Baker, M.C., Perkerson, R.B., 3rd, Castanedes-Casey, M., Rousseau, L., Benussi, L., Binetti, G., Ghidoni, R., Hsiung, G.Y., Mackenzie, I.R., Finger, E., Boeve, B.F., Ertekin-Taner, N., Graff-Radford, N.R., Dickson, D.W. and Rademakers, R., 2013. TMEM106B p.T185S regulates TMEM106B protein levels: implications for frontotemporal dementia. *J Neurochem.* 126, 781-91. 10.1111/jnc.12329.
- Nicholson, A.M., Zhou, X., Perkerson, R.B., Parsons, T.M., Chew, J., Brooks, M., DeJesus-Hernandez, M., Finch, N.A., Matchett, B.J., Kurti, A., Jansen-West, K.R., Perkerson, E., Daugherty, L., Castanedes-Casey, M., Rousseau, L., Phillips, V., Hu, F., Gendron, T.F., Murray, M.E., Dickson, D.W., Fryer, J.D., Petrucelli, L. and Rademakers, R., 2018. Loss of Tmem106b is unable to ameliorate frontotemporal dementia-like phenotypes in an AAV mouse model of C9ORF72-repeat induced toxicity. *Acta Neuropathol Commun.* 6, 42. 10.1186/s40478-018-0545-x.
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V.E., MacKeigan, J.P., Porter, J.A., Wang, Y.K., Cantley, L.C., Finan, P.M. and Murphy, L.O., 2009. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell.* 136, 521-34. 10.1016/j.cell.2008.11.044.
- Niebroj-Dobosz, I., Janik, P., Sokolowska, B. and Kwiecinski, H., 2010. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 17, 226-31. 10.1111/j.1468-1331.2009.02775.x.
- Nixon, R.A., 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med.* 19, 983-97. 10.1038/nm.3232.
- Nomura, T., Watanabe, S., Kaneko, K., Yamanaka, K., Nukina, N. and Furukawa, Y., 2014. Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 289, 1192-202. 10.1074/jbc.M113.516492.
- Nonaka, T., Masuda-Suzukake, M., Arai, T., Hasegawa, Y., Akatsu, H., Obi, T., Yoshida, M., Murayama, S., Mann, D.M., Akiyama, H. and Hasegawa, M., 2013. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep.* 4, 124-34. 10.1016/j.celrep.2013.06.007.
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D.G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Lohr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., Reichert, A.S., Terzic, J., Dotsch, V., Ney, P.A. and Dikic, I., 2010. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* 11, 45-51. 10.1038/embor.2009.256.
- Nyberg, J., Aberg, M.A., Schioler, L., Nilsson, M., Wallin, A., Toren, K. and Kuhn, H.G., 2014. Cardiovascular and cognitive fitness at age 18 and risk of early-onset dementia. *Brain.* 137, 1514-23. 10.1093/brain/awu041.
- O'Rourke, J.G., Bogdanik, L., Yanez, A., Lall, D., Wolf, A.J., Muhammad, A.K., Ho, R., Carmona, S., Vit, J.P., Zarrow, J., Kim, K.J., Bell, S., Harms, M.B., Miller, T.M., Dangler, C.A., Underhill, D.M., Goodridge, H.S., Lutz, C.M. and Baloh, R.H., 2016. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science.* 351, 1324-9. 10.1126/science.aaf1064.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J.A., Urano, F. and Imaizumi, K., 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 26, 9220-31. 10.1128/MCB.01453-06.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N. and Ohsumi, Y., 2009. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell.* 17, 87-97. 10.1016/j.devcel.2009.06.013.
- Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., Yasuda, M., Osuga, H., Nishimoto, T., Narumiya, S. and Ikeda,



- J.E., 2003. ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet.* 12, 1671-87.
- Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S.T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A.L., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J.P. and Rene, F., 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, 526-46. 10.15252/emmm.201404433.
- Park, J.M., Tougeron, D., Huang, S., Okamoto, K. and Sinicrope, F.A., 2014. Beclin 1 and UVRAG confer protection from radiation-induced DNA damage and maintain centrosome stability in colorectal cancer cells. *PLoS One.* 9, e100819. 10.1371/journal.pone.0100819.
- Park, S.Y., Kim, S.M., Sung, J.J., Lee, K.M., Park, K.S., Kim, S.Y., Nam, H.W. and Lee, K.W., 2013. Nocturnal hypoxia in ALS is related to cognitive dysfunction and can occur as clusters of desaturations. *PLoS One.* 8, e75324. 10.1371/journal.pone.0075324.
- Parkinson, N., Ince, P.G., Smith, M.O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P.M., Morrison, K.E., Pall, H.S., Hardiman, O., Collinge, J., Shaw, P.J., Fisher, E.M., Study, M.R.C.P.i.A. and Consortium, F.R., 2006. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology.* 67, 1074-7. 10.1212/01.wnl.0000231510.89311.8b.
- Paton, L., Bitoun, E., Kenyon, J., Priestman, D.A., Oliver, P.L., Edwards, B., Platt, F.M. and Davies, K.E., 2014. A novel mouse model of a patient mucopolysaccharidosis II mutation recapitulates disease pathology. *J Biol Chem.* 289, 26709-21. 10.1074/jbc.M114.586156.
- Peralta, O.A. and Eyestone, W.H., 2009. Quantitative and qualitative analysis of cellular prion protein (PrP(C)) expression in bovine somatic tissues. *Prion.* 3, 161-70.
- Petanceska, S.S. and Gandy, S., 1999. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin alters the metabolism of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Neurochem.* 73, 2316-20.
- Peters, A. and Kaiserman-Abramof, I.R., 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat.* 127, 321-55. 10.1002/aja.1001270402.
- Picone, P., Nuzzo, D., Caruana, L., Messina, E., Barera, A., Vasto, S. and Di Carlo, M., 2015. Metformin increases APP expression and processing via oxidative stress, mitochondrial dysfunction and NF-kappaB activation: Use of insulin to attenuate metformin's effect. *Biochim Biophys Acta.* 1853, 1046-59. 10.1016/j.bbamcr.2015.01.017.
- Pilli, M., Arko-Mensah, J., Ponpuak, M., Roberts, E., Master, S., Mandell, M.A., Dupont, N., Ornatowski, W., Jiang, S., Bradfute, S.B., Bruun, J.A., Hansen, T.E., Johansen, T. and Deretic, V., 2012. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity.* 37, 223-34. 10.1016/j.immuni.2012.04.015.
- Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K.R., Huelga, S.C., Moran, J., Liang, T.Y., Ling, S.C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., Kordasiewicz, H., Sedaghat, Y., Donohue, J.P., Shiue, L., Bennett, C.F., Yeo, G.W. and Cleveland, D.W., 2011. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci.* 14, 459-68. 10.1038/nn.2779.
- Pradat, P.F., Dubourg, O., de Tapia, M., di Scala, F., Dupuis, L., Lenglet, T., Bruneteau, G., Salachas, F., Lacomblez, L., Corvol, J.C., Demougin, P., Primig, M., Meininger, V., Loeffler, J.P. and Gonzalez de Aguilar, J.L., 2012. Muscle gene expression is a marker of amyotrophic lateral sclerosis severity. *Neurodegener Dis.* 9, 38-52. 10.1159/000329723.
- Pradat, P.F., Bruneteau, G., Gordon, P.H., Dupuis, L., Bonnefont-Rousselot, D., Simon, D., Salachas, F., Corcia, P., Frochot, V., Lacorte, J.M., Jardel, C., Coussieu, C., Le Forestier, N., Lacomblez, L., Loeffler, J.P. and Meininger, V., 2010. Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 11, 166-71. 10.3109/17482960902822960.

- Pramatarova, A., Laganier, J., Roussel, J., Brisebois, K. and Rouleau, G.A., 2001. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci.* 21, 3369-74. 10.1523/JNEUROSCI.21-10-03369.2001.
- Procter, A.W., Qurne, M. and Francis, P.T., 1999. Neurochemical features of frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 10 Suppl 1, 80-4. 10.1159/000051219.
- Qian, K., Huang, H., Peterson, A., Hu, B., Maragakis, N.J., Ming, G.L., Chen, H. and Zhang, S.C., 2017. Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports.* 8, 843-855. 10.1016/j.stemcr.2017.03.003.
- Qiang, L., Zhao, B., Shah, P., Sample, A., Yang, S. and He, Y.Y., 2016. Autophagy positively regulates DNA damage recognition by nucleotide excision repair. *Autophagy.* 12, 357-68. 10.1080/15548627.2015.1110667.
- Race, R.E., Priola, S.A., Bessen, R.A., Ernst, D., Dockter, J., Rall, G.F., Mucke, L., Chesebro, B. and Oldstone, M.B., 1995. Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron.* 15, 1183-91.
- Rademakers, R., Cruts, M. and van Broeckhoven, C., 2004. The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Hum Mutat.* 24, 277-95. 10.1002/humu.20086.
- Rademakers, R., Stewart, H., DeJesus-Hernandez, M., Krieger, C., Graff-Radford, N., Fabros, M., Briemberg, H., Cashman, N., Eisen, A. and Mackenzie, I.R., 2010. Fus gene mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 42, 170-6. 10.1002/mus.21665.
- Radford, H., Moreno, J.A., Verity, N., Halliday, M. and Mallucci, G.R., 2015. PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol.* 130, 633-42. 10.1007/s00401-015-1487-z.
- Radoshevich, L., Murrow, L., Chen, N., Fernandez, E., Roy, S., Fung, C. and Debnath, J., 2010. ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell.* 142, 590-600. 10.1016/j.cell.2010.07.018.
- Rao, V.A., Klein, S.R., Bonar, S.J., Zielonka, J., Mizuno, N., Dickey, J.S., Keller, P.W., Joseph, J., Kalyanaraman, B. and Shacter, E., 2010. The antioxidant transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy and growth arrest induced by the anticancer redox agent mitomycin. *J Biol Chem.* 285, 34447-59. 10.1074/jbc.M110.133579.
- Rascovsky, K., Hodges, J.R., Knopman, D., Mendez, M.F., Kramer, J.H., Neuhaus, J., van Swieten, J.C., Seelaar, H., Dopper, E.G., Onyike, C.U., Hillis, A.E., Josephs, K.A., Boeve, B.F., Kertesz, A., Seeley, W.W., Rankin, K.P., Johnson, J.K., Gorno-Tempini, M.L., Rosen, H., Prioleau-Latham, C.E., Lee, A., Kipps, C.M., Lillo, P., Piguet, O., Rohrer, J.D., Rossor, M.N., Warren, J.D., Fox, N.C., Galasko, D., Salmon, D.P., Black, S.E., Mesulam, M., Weintraub, S., Dickerson, B.C., Diehl-Schmid, J., Pasquier, F., Deramecourt, V., Lebert, F., Pijnenburg, Y., Chow, T.W., Manes, F., Grafman, J., Cappa, S.F., Freedman, M., Grossman, M. and Miller, B.L., 2011. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain.* 134, 2456-77. 10.1093/brain/awr179.
- Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K. and Hodges, J.R., 2002. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology.* 58, 1615-21. 10.1212/WNL.58.11.1615.
- Ratti, A., Corrado, L., Castellotti, B., Del Bo, R., Fogh, I., Cereda, C., Tiloca, C., D'Ascenzo, C., Bagarotti, A., Pensato, V., Ranieri, M., Gagliardi, S., Calini, D., Mazzini, L., Taroni, F., Corti, S., Ceroni, M., Oggioni, G.D., Lin, K., Powell, J.F., Soraru, G., Ticozzi, N., Comi, G.P., D'Alfonso, S., Gellera, C., Silani, V. and Consortium, S., 2012. C9ORF72 repeat expansion in a large Italian ALS cohort: evidence of a founder effect. *Neurobiol Aging.* 33, 2528 e7-14. 10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.008.

- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. and Rubinsztein, D.C., 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol.* 12, 747-57. 10.1038/ncb2078.
- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C.J., Brown, S.D. and Rubinsztein, D.C., 2005. Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat Genet.* 37, 771-6. 10.1038/ng1591.
- Reczek, D., Schwake, M., Schroder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T. and Saftig, P., 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell.* 131, 770-83. 10.1016/j.cell.2007.10.018.
- Ren, Y., van Blitterswijk, M., Allen, M., Carrasquillo, M.M., Reddy, J.S., Wang, X., Beach, T.G., Dickson, D.W., Ertekin-Taner, N., Asmann, Y.W. and Rademakers, R., 2018. TMEM106B haplotypes have distinct gene expression patterns in aged brain. *Mol Neurodegener.* 13, 35. 10.1186/s13024-018-0268-2.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A.M., Kaganovich, A., Scholz, S.W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D.W., Hernandez, D.G., Johnson, J.O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R.J., Orrell, R.W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I.E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J.B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M.A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V.M., Kaivorinne, A.L., Holtta-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chio, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., Consortium, I., Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J.D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E.E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N.M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H.R., Tienari, P.J. and Traynor, B.J., 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 72, 257-68. 10.1016/j.neuron.2011.09.010.
- Richter, B., Sliter, D.A., Herhaus, L., Stolz, A., Wang, C., Beli, P., Zaffagnini, G., Wild, P., Martens, S., Wagner, S.A., Youle, R.J. and Dikic, I., 2016. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113, 4039-44. 10.1073/pnas.1523926113.
- Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., Morrison, J.H. and Gordon, J.W., 1995. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 689-93.
- Rodriguez-Hernandez, A., Cordero, M.D., Salviati, L., Artuch, R., Pineda, M., Briones, P., Gomez Izquierdo, L., Cotan, D., Navas, P. and Sanchez-Alcazar, J.A., 2009. Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy.* 5, 19-32.
- Rogalski, E., Cobia, D., Harrison, T.M., Wieneke, C., Weintraub, S. and Mesulam, M.M., 2011. Progression of language decline and cortical atrophy in subtypes of primary progressive aphasia. *Neurology.* 76, 1804-10. 10.1212/WNL.0b013e31821ccd3c.
- Rohrer, J.D., Nicholas, J.M., Cash, D.M., van Swieten, J., Dopper, E., Jiskoot, L., van Minkelen, R., Rombouts, S.A., Cardoso, M.J., Clegg, S., Espak, M., Mead, S., Thomas, D.L., De Vita, E., Masellis, M., Black, S.E., Freedman, M., Keren, R., MacIntosh, B.J., Rogaeva, E., Tang-Wai, D., Tartaglia, M.C., Laforce, R., Jr., Tagliavini, F., Tiraboschi, P., Redaelli, V., Prioni, S., Grisoli, M., Borroni, B., Padovani, A., Galimberti, D., Scarpini, E., Arighi, A., Fumagalli, G., Rowe, J.B., Coyle-Gilchrist, I., Graff, C., Fallstrom, M., Jelic, V., Stahlbom, A.K., Andersson, C., Thonberg, H., Lilius, L., Frisoni, G.B., Pievani, M., Bocchetta, M., Benussi, L., Ghidoni, R., Finger, E., Sorbi, S., Nacmias, B., Lombardi, G., Polito, C., Warren, J.D., Ourselin, S., Fox, N.C., Rossor, M.N. and Binetti, G., 2015. Presymptomatic cognitive and neuroanatomical changes in genetic frontotemporal dementia in the

- Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI) study: a cross-sectional analysis. *Lancet Neurol.* 14, 253-62. 10.1016/S1474-4422(14)70324-2.
- Ron, D. and Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 519-29. 10.1038/nrm2199.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X. and et al., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362, 59-62. 10.1038/362059a0.
- Rosen, H.J., Gorno-Tempini, M.L., Goldman, W.P., Perry, R.J., Schuff, N., Weiner, M., Feiwell, R., Kramer, J.H. and Miller, B.L., 2002. Patterns of brain atrophy in frontotemporal dementia and semantic dementia. *Neurology.* 58, 198-208.
- Rosso, S.M., Landweer, E.J., Houterman, M., Donker Kaat, L., van Duijn, C.M. and van Swieten, J.C., 2003a. Medical and environmental risk factors for sporadic frontotemporal dementia: a retrospective case-control study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 74, 1574-6.
- Rosso, S.M., Donker Kaat, L., Baks, T., Joosse, M., de Koning, I., Pijnenburg, Y., de Jong, D., Dooijes, D., Kamphorst, W., Ravid, R., Niermeijer, M.F., Verheij, F., Kremer, H.P., Scheltens, P., van Duijn, C.M., Heutink, P. and van Swieten, J.C., 2003b. Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain.* 126, 2016-22. 10.1093/brain/awg204.
- Rothstein, J.D., 2017. Edo-rivastigmine: A new drug approved for ALS. *Cell.* 171, 725. 10.1016/j.cell.2017.10.011.
- Row, P.E., Prior, I.A., McCullough, J., Clague, M.J. and Urbe, S., 2006. The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J Biol Chem.* 281, 12618-24. 10.1074/jbc.M512615200.
- Ryu, H.H., Jun, M.H., Min, K.J., Jang, D.J., Lee, Y.S., Kim, H.K. and Lee, J.A., 2014. Autophagy regulates amyotrophic lateral sclerosis-linked fused in sarcoma-positive stress granules in neurons. *Neurobiol Aging.* 35, 2822-2831. 10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.026.
- Saccon, R.A., Bunton-Stasyshyn, R.K., Fisher, E.M. and Fratta, P., 2013. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain.* 136, 2342-58. 10.1093/brain/awt097.
- Sakai, M. and Ogawa, K., 1982. Energy-dependent lysosomal wrapping mechanism (LWM) during autophagolysosome formation. *Histochemistry.* 76, 479-88.
- Sakai, M., Araki, N. and Ogawa, K., 1989. Lysosomal movements during heterophagy and autophagy: with special reference to nematolysosome and wrapping lysosome. *J Electron Microsc Tech.* 12, 101-31. 10.1002/jemt.1060120206.
- Santini, E., Heiman, M., Greengard, P., Valjent, E. and Fisone, G., 2009. Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. *Sci Signal.* 2, ra36. 10.1126/scisignal.2000308.
- Sasayama, H., Shimamura, M., Tokuda, T., Azuma, Y., Yoshida, T., Mizuno, T., Nakagawa, M., Fujikake, N., Nagai, Y. and Yamaguchi, M., 2012. Knockdown of the *Drosophila* fused in sarcoma (FUS) homologue causes deficient locomotive behavior and shortening of motoneuron terminal branches. *PLoS One.* 7, e39483. 10.1371/journal.pone.0039483.
- Saxena, S., Cabuy, E. and Caroni, P., 2009. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci.* 12, 627-36. 10.1038/nn.2297.
- Scarmeas, N., Shih, T., Stern, Y., Ottman, R. and Rowland, L.P., 2002. Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in ALS. *Neurology.* 59, 773-5.

- 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, M.C., Qiu, J., Zhou, Y., Li, H., Fu, X.D., Rouaux, C., Shelkovnikova, T., Witting, A., Ludolph, A.C., Kiefer, F., Storkebaum, E., Lagier-Tourenne, C. and Dupuis, L., 2016. Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J.* 35, 1077-97. 10.15252/embj.201592559.
- Scherling, C.S., Hall, T., Berisha, F., Klepac, K., Karydas, A., Coppola, G., Kramer, J.H., Rabinovici, G., Ahljianian, M., Miller, B.L., Seeley, W., Grinberg, L.T., Rosen, H., Meredith, J., Jr. and Boxer, A.L., 2014. Cerebrospinal fluid neurofilament concentration reflects disease severity in frontotemporal degeneration. *Ann Neurol.* 75, 116-26. 10.1002/ana.24052.
- Schmidt, O. and Teis, D., 2012. The ESCRT machinery. *Curr Biol.* 22, R116-20. 10.1016/j.cub.2012.01.028.
- Schroder, M. and Kaufman, R.J., 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 74, 739-89. 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134.
- Schwenk, B.M., Lang, C.M., Hogg, S., Tahirovic, S., Orozco, D., Rentzsch, K., Lichtenthaler, S.F., Hoogenraad, C.C., Capell, A., Haass, C. and Edbauer, D., 2014. The FTL risk factor TMEM106B and MAP6 control dendritic trafficking of lysosomes. *EMBO J.* 33, 450-67. 10.1002/embj.201385857.
- Schwenk, B.M., Hartmann, H., Serdaroglu, A., Schludi, M.H., Hornburg, D., Meissner, F., Orozco, D., Colombo, A., Tahirovic, S., Michaelsen, M., Schreiber, F., Haupt, S., Peitz, M., Brustle, O., Kupper, C., Klopstock, T., Otto, M., Ludolph, A.C., Arzberger, T., Kuhn, P.H. and Edbauer, D., 2016. TDP-43 loss of function inhibits endosomal trafficking and alters trophic signaling in neurons. *EMBO J.* 35, 2350-2370. 10.15252/embj.201694221.
- Scott, S.V., Baba, M., Ohsumi, Y. and Klionsky, D.J., 1997. Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J Cell Biol.* 138, 37-44.
- Sellier, C., Campanari, M.L., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynel, I., Oulad-Abdelghani, M., Ruffenach, F., Page, A., Ciura, S., Kabashi, E. and Charlet-Berguerand, N., 2016. Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *EMBO J.* 35, 1276-97. 10.15252/embj.201593350.
- Sephton, C.F., Good, S.K., Atkin, S., Dewey, C.M., Mayer, P., 3rd, Herz, J. and Yu, G., 2010. TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *J Biol Chem.* 285, 6826-34. 10.1074/jbc.M109.061846.
- Sephton, C.F., Cenik, C., Kucukural, A., Dammer, E.B., Cenik, B., Han, Y., Dewey, C.M., Roth, F.P., Herz, J., Peng, J., Moore, M.J. and Yu, G., 2011. Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem.* 286, 1204-15. 10.1074/jbc.M110.190884.
- Shacka, J.J. and Roth, K.A., 2007. Cathepsin D deficiency and NCL/Batten disease: there's more to death than apoptosis. *Autophagy.* 3, 474-6.
- Shaikh, A.Y. and Martin, L.J., 2002. DNA base-excision repair enzyme apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox factor-1 is increased and competent in the brain and spinal cord of individuals with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromolecular Med.* 2, 47-60. 10.1007/s12017-002-0038-7.
- Shao, J., Yang, X., Liu, T., Zhang, T., Xie, Q.R. and Xia, W., 2016. Autophagy induction by SIRT6 is involved in oxidative stress-induced neuronal damage. *Protein Cell.* 7, 281-290. 10.1007/s13238-016-0257-6.
- Shaw, P.J., Ince, P.G., Falkous, G. and Mantle, D., 1995. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol.* 38, 691-5. 10.1002/ana.410380424.
- Shen, W.C., Li, H.Y., Chen, G.C., Chern, Y. and Tu, P.H., 2015. Mutations in the ubiquitin-binding domain of OPTN/optineurin interfere with autophagy-mediated degradation of misfolded proteins by a dominant-negative mechanism. *Autophagy.* 11, 685-700. 10.4161/auto.36098.

Shi, C.S. and Kehrl, J.H., 2008. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J Biol Chem.* 283, 33175-82. 10.1074/jbc.M804478200.

Shi, Y., Lin, S., Staats, K.A., Li, Y., Chang, W.H., Hung, S.T., Hendricks, E., Linares, G.R., Wang, Y., Son, E.Y., Wen, X., Kisler, K., Wilkinson, B., Menendez, L., Sugawara, T., Woolwine, P., Huang, M., Cowan, M.J., Ge, B., Koutsodendris, N., Sandor, K.P., Komberg, J., Vangoor, V.R., Senthilkumar, K., Hennes, V., Seah, C., Nelson, A.R., Cheng, T.Y., Lee, S.J., August, P.R., Chen, J.A., Wisniewski, N., Hanson-Smith, V., Belgard, T.G., Zhang, A., Coba, M., Grunseich, C., Ward, M.E., van den Berg, L.H., Pasterkamp, R.J., Trotti, D., Zlokovic, B.V. and Ichida, J.K., 2018. Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nat Med.* 24, 313-325. 10.1038/nm.4490.

Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S. and Kobayashi, M., 2001. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res.* 917, 97-104.

Simon, N.G., Lagopoulos, J., Paling, S., Pfluger, C., Park, S.B., Howells, J., Gallagher, T., Kliot, M., Henderson, R.D., Vucic, S. and Kiernan, M.C., 2017. Peripheral nerve diffusion tensor imaging as a measure of disease progression in ALS. *J Neurol.* 264, 882-890. 10.1007/s00415-017-8443-x.

Simpson, E.P., Henry, Y.K., Henkel, J.S., Smith, R.G. and Appel, S.H., 2004. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology.* 62, 1758-65.

Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A. and Deretic, V., 2006. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science.* 313, 1438-41. 10.1126/science.1129577.

Sjogren, M., Folkesson, S., Blennow, K. and Tarkowski, E., 2004. Increased intrathecal inflammatory activity in frontotemporal dementia: pathophysiological implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75, 1107-11. 10.1136/jnnp.2003.019422.

Skibinski, G., Parkinson, N.J., Brown, J.M., Chakrabarti, L., Lloyd, S.L., Hummerich, H., Nielsen, J.E., Hodges, J.R., Spillantini, M.G., Thusgaard, T., Brandner, S., Brun, A., Rossor, M.N., Gade, A., Johannsen, P., Sorensen, S.A., Gydesen, S., Fisher, E.M. and Collinge, J., 2005. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet.* 37, 806-8. 10.1038/ng1609.

Skourti-Stathaki, K. and Proudfoot, N.J., 2014. A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes Dev.* 28, 1384-96. 10.1101/gad.242990.114.

Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K.G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Wakatsuki, S. and Stenmark, H., 2005. Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem.* 280, 19600-6. 10.1074/jbc.M501510200.

Slaugenhaupt, S.A., 2002. The molecular basis of mucopolidosis type IV. *Curr Mol Med.* 2, 445-50.

Song, Y., Du, Y., Zou, W., Luo, Y., Zhang, X. and Fu, J., 2018. Involvement of impaired autophagy and mitophagy in Neuro-2a cell damage under hypoxic and/or high-glucose conditions. *Sci Rep.* 8, 3301. 10.1038/s41598-018-20162-1.

Soo, K.Y., Sultana, J., King, A.E., Atkinson, R., Warraich, S.T., Sundaramoorthy, V., Blair, I., Farg, M.A. and Atkin, J.D., 2015. ALS-associated mutant FUS inhibits macroautophagy which is restored by overexpression of Rab1. *Cell Death Discov.* 1, 15030. 10.1038/cddiscovery.2015.30.

Spillantini, M.G. and Goedert, M., 2013. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 12, 609-22. 10.1016/S1474-4422(13)70090-5.

Spilman, P., Podluskaya, N., Hart, M.J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R. and Galvan, V., 2010. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and

reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 5, e9979. 10.1371/journal.pone.0009979.

Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P.F., Le Forestier, N., Marouan, A., Dib, M. and Meininger, V., 2002. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci*. 193, 73-8.

Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., Baralle, F., de Bellerocche, J., Mitchell, J.D., Leigh, P.N., Al-Chalabi, A., Miller, C.C., Nicholson, G. and Shaw, C.E., 2008. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 319, 1668-72. 10.1126/science.1154584.

Staats, K.A., Hernandez, S., Schonefeldt, S., Bento-Abreu, A., Dooley, J., Van Damme, P., Liston, A., Robberecht, W. and Van Den Bosch, L., 2013. Rapamycin increases survival in ALS mice lacking mature lymphocytes. *Mol Neurodegener*. 8, 31. 10.1186/1750-1326-8-31.

Steketee, R.M., Bron, E.E., Meijboom, R., Houston, G.C., Klein, S., Mutsaerts, H.J., Mendez Orellana, C.P., de Jong, F.J., van Swieten, J.C., van der Lugt, A. and Smits, M., 2016. Early-stage differentiation between presenile Alzheimer's disease and frontotemporal dementia using arterial spin labeling MRI. *Eur Radiol*. 26, 244-53. 10.1007/s00330-015-3789-x.

Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., Levade, T., Astudillo, L., Serratrice, J., Brassier, A., Rose, C., Billette de Villemeur, T. and Berger, M.G., 2017. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci*. 18, 10.3390/ijms18020441.

Stjepanovic, G., Baskaran, S., Lin, M.G. and Hurley, J.H., 2017. Vps34 Kinase Domain Dynamics Regulate the Autophagic PI 3-Kinase Complex. *Mol Cell*. 67, 528-534 e3. 10.1016/j.molcel.2017.07.003.

Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F. and Hawkins, P.T., 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*. 277, 567-70.

Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. and Gottlinger, H.G., 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*. 114, 689-99.

Strong, M.J., Grace, G.M., Orange, J.B., Leeper, H.A., Menon, R.S. and Aere, C., 1999. A prospective study of cognitive impairment in ALS. *Neurology*. 53, 1665-70.

Struyfs, H., Van Broeck, B., Timmers, M., Franssen, E., Slegers, K., Van Broeckhoven, C., De Deyn, P.P., Streffer, J.R., Mercken, M. and Engelborghs, S., 2015. Diagnostic Accuracy of Cerebrospinal Fluid Amyloid-beta Isoforms for Early and Differential Dementia Diagnosis. *J Alzheimers Dis*. 45, 813-22. 10.3233/JAD-141986.

Su, M., Guan, H., Zhang, F., Gao, Y., Teng, X. and Yang, W., 2016. HDAC6 Regulates the Chaperone-Mediated Autophagy to Prevent Oxidative Damage in Injured Neurons after Experimental Spinal Cord Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2016, 7263736. 10.1155/2016/7263736.

Sun, S., Ling, S.C., Qiu, J., Albuquerque, C.P., Zhou, Y., Tokunaga, S., Li, H., Qiu, H., Bui, A., Yeo, G.W., Huang, E.J., Eggan, K., Zhou, H., Fu, X.D., Lagier-Tourenne, C. and Cleveland, D.W., 2015. ALS-causative mutations in FUS/TLS confer gain and loss of function by altered association with SMN and U1-snRNP. *Nat Commun*. 6, 6171. 10.1038/ncomms7171.

Suzuki, H. and Matsuoka, M., 2016. The Lysosomal Trafficking Transmembrane Protein 106B Is Linked to Cell Death. *J Biol Chem*. 291, 21448-21460. 10.1074/jbc.M116.737171.

- Takahashi, I., Hama, Y., Matsushima, M., Hirotsu, M., Kano, T., Hohzen, H., Yabe, I., Utsumi, J. and Sasaki, H., 2015. Identification of plasma microRNAs as a biomarker of sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Brain*. 8, 67. 10.1186/s13041-015-0161-7.
- Takahashi, K., Mashima, H., Miura, K., Maeda, D., Goto, A., Goto, T., Sun-Wada, G.H., Wada, Y. and Ohnishi, H., 2017. Disruption of Small GTPase Rab7 Exacerbates the Severity of Acute Pancreatitis in Experimental Mouse Models. *Sci Rep*. 7, 2817. 10.1038/s41598-017-02988-3.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H.D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J.U., Cheng, J.Q., Mule, J.J., Pledger, W.J. and Wang, H.G., 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*. 9, 1142-51. 10.1038/ncb1634.
- Talbot, K., 2002. Motor neurone disease. *Postgrad Med J*. 78, 513-9.
- Tan, S.C., Scherer, J. and Vallee, R.B., 2011. Recruitment of dynein to late endosomes and lysosomes through light intermediate chains. *Mol Biol Cell*. 22, 467-77. 10.1091/mbc.E10-02-0129.
- Tan, X., Azad, S. and Ji, X., 2018. Hypoxic Preconditioning Protects SH-SY5Y Cell against Oxidative Stress through Activation of Autophagy. *Cell Transplant*. 963689718760486. 10.1177/0963689718760486.
- Tanaka, S., Hikita, H., Tatsumi, T., Sakamori, R., Nozaki, Y., Sakane, S., Shiode, Y., Nakabori, T., Saito, Y., Hiramatsu, N., Tabata, K., Kawabata, T., Hamasaki, M., Eguchi, H., Nagano, H., Yoshimori, T. and Takehara, T., 2016. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology*. 64, 1994-2014. 10.1002/hep.28820.
- Tanaka, Y., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K. and Nishihara, M., 2013. Increased lysosomal biogenesis in activated microglia and exacerbated neuronal damage after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. *Neuroscience*. 250, 8-19. 10.1016/j.neuroscience.2013.06.049.
- Tanaka, Y., Chambers, J.K., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K. and Nishihara, M., 2014. Possible involvement of lysosomal dysfunction in pathological changes of the brain in aged progranulin-deficient mice. *Acta Neuropathol Commun*. 2, 78. 10.1186/s40478-014-0078-x.
- Tanaka, Y., Suzuki, G., Matsuwaki, T., Hosokawa, M., Serrano, G., Beach, T.G., Yamanouchi, K., Hasegawa, M. and Nishihara, M., 2017. Progranulin regulates lysosomal function and biogenesis through acidification of lysosomes. *Hum Mol Genet*. 26, 969-988. 10.1093/hmg/ddx011.
- Tandan, R., Robison, S.H., Munzer, J.S. and Bradley, W.G., 1987. Deficient DNA repair in amyotrophic lateral sclerosis cells. *J Neurol Sci*. 79, 189-203.
- Tappino, B., Biancheri, R., Mort, M., Regis, S., Corsolini, F., Rossi, A., Stroppiano, M., Lualdi, S., Fiumara, A., Bembi, B., Di Rocco, M., Cooper, D.N. and Filocamo, M., 2010. Identification and characterization of 15 novel GALC gene mutations causing Krabbe disease. *Hum Mutat*. 31, E1894-914. 10.1002/humu.21367.
- Tateishi, T., Hokonohara, T., Yamasaki, R., Miura, S., Kikuchi, H., Iwaki, A., Tashiro, H., Furuya, H., Nagara, Y., Ohyagi, Y., Nukina, N., Iwaki, T., Fukumaki, Y. and Kira, J., 2010. Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. *Acta Neuropathol*. 119, 355-64. 10.1007/s00401-009-0621-1.
- Taylor, J.P., Brown, R.H., Jr. and Cleveland, D.W., 2016. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 539, 197-206. 10.1038/nature20413.
- Teyssou, E., Chartier, L., Amador, M.D., Lam, R., Lautrette, G., Nicol, M., Machat, S., Da Barroca, S., Moigneu, C., Mairey, M., Larmonier, T., Saker, S., Dussert, C., Forlani, S., Fontaine, B., Seilhean, D., Bohl, D., Boillee, S., Meininger, V., Couratier, P., Salachas, F., Stevanin, G. and Millecamps, S., 2017. Novel UBQLN2 mutations linked to amyotrophic lateral sclerosis and atypical hereditary spastic



- paraplegia phenotype through defective HSP70-mediated proteolysis. *Neurobiol Aging*. 58, 239 e11-239 e20. 10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.018.
- Thompson, S.A., Patterson, K. and Hodges, J.R., 2003. Left/right asymmetry of atrophy in semantic dementia: behavioral-cognitive implications. *Neurology*. 61, 1196-203.
- Toivonen, J.M., Manzano, R., Olivan, S., Zaragoza, P., Garcia-Redondo, A. and Osta, R., 2014. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 9, e89065. 10.1371/journal.pone.0089065.
- Tokuda, E., Brannstrom, T., Andersen, P.M. and Marklund, S.L., 2016. Low autophagy capacity implicated in motor system vulnerability to mutant superoxide dismutase. *Acta Neuropathol Commun*. 4, 6. 10.1186/s40478-016-0274-y.
- Traxinger, K., Kelly, C., Johnson, B.A., Lyles, R.H. and Glass, J.D., 2013. Prognosis and epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: Analysis of a clinic population, 1997-2011. *Neurol Clin Pract*. 3, 313-320. 10.1212/CPJ.0b013e3182a1b8ab.
- Traynor, B.J., Codd, M.B., Corr, B., Forde, C., Frost, E. and Hardiman, O., 2000. Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: a population-based study. *Arch Neurol*. 57, 109-13.
- Turner, M.R., Goldacre, R., Ramagopalan, S., Talbot, K. and Goldacre, M.J., 2013. Autoimmune disease preceding amyotrophic lateral sclerosis: an epidemiologic study. *Neurology*. 81, 1222-5. 10.1212/WNL.0b013e3182a6cc13.
- Turner, M.R., Cagnin, A., Turkheimer, F.E., Miller, C.C., Shaw, C.E., Brooks, D.J., Leigh, P.N. and Banati, R.B., 2004. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis*. 15, 601-9. 10.1016/j.nbd.2003.12.012.
- Turner, M.R., Al-Chalabi, A., Chio, A., Hardiman, O., Kiernan, M.C., Rohrer, J.D., Rowe, J., Seeley, W. and Talbot, K., 2017. Genetic screening in sporadic ALS and FTD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 88, 1042-1044. 10.1136/jnnp-2017-315995.
- Tysnes, O.B., Vollset, S.E. and Aarli, J.A., 1991. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Hordaland county, western Norway. *Acta Neurol Scand*. 83, 280-5.
- Ueno, T. and Komatsu, M., 2017. Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 14, 170-184. 10.1038/nrgastro.2016.185.
- Ugolino, J., Ji, Y.J., Conchina, K., Chu, J., Nirujogi, R.S., Pandey, A., Brady, N.R., Hamacher-Brady, A. and Wang, J., 2016. Loss of C9orf72 Enhances Autophagic Activity via Deregulated mTOR and TFEB Signaling. *PLoS Genet*. 12, e1006443. 10.1371/journal.pgen.1006443.
- Ulrich, H.D. and Walden, H., 2010. Ubiquitin signalling in DNA replication and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11, 479-89. 10.1038/nrm2921.
- Underwood, B.R., Imarisio, S., Fleming, A., Rose, C., Krishna, G., Heard, P., Quick, M., Korolchuk, V.I., Renna, M., Sarkar, S., Garcia-Arencibia, M., O'Kane, C.J., Murphy, M.P. and Rubinsztein, D.C., 2010. Antioxidants can inhibit basal autophagy and enhance neurodegeneration in models of polyglutamine disease. *Hum Mol Genet*. 19, 3413-29. 10.1093/hmg/ddq253.
- Urwin, H., Ghazi-Noori, S., Collinge, J. and Isaacs, A., 2009. The role of CHMP2B in frontotemporal dementia. *Biochem Soc Trans*. 37, 208-12. 10.1042/BST0370208.
- Urwin, H., Authier, A., Nielsen, J.E., Metcalf, D., Powell, C., Froud, K., Malcolm, D.S., Holm, I., Johannsen, P., Brown, J., Fisher, E.M., van der Zee, J., Bruyland, M., Consortium, F.R., Van Broeckhoven, C., Collinge, J., Brandner, S., Futter, C. and Isaacs, A.M., 2010. Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Hum Mol Genet*. 19, 2228-38. 10.1093/hmg/ddq100.

- Valanne, S., Wang, J.H. and Ramet, M., 2011. The Drosophila Toll signaling pathway. *J Immunol.* 186, 649-56. 10.4049/jimmunol.1002302.
- Valdez, C., Wong, Y.C., Schwake, M., Bu, G., Wszolek, Z.K. and Krainc, D., 2017. Progranulin-mediated deficiency of cathepsin D results in FTD and NCL-like phenotypes in neurons derived from FTD patients. *Hum Mol Genet.* 26, 4861-4872. 10.1093/hmg/ddx364.
- van Blitterswijk, M., Vlam, L., van Es, M.A., van der Pol, W.L., Hennekam, E.A., Dooijes, D., Schelhaas, H.J., van der Kooij, A.J., de Visser, M., Veldink, J.H. and van den Berg, L.H., 2012a. Genetic overlap between apparently sporadic motor neuron diseases. *PLoS One.* 7, e48983. 10.1371/journal.pone.0048983.
- van Blitterswijk, M., van Es, M.A., Hennekam, E.A., Dooijes, D., van Rheenen, W., Medic, J., Bourque, P.R., Schelhaas, H.J., van der Kooij, A.J., de Visser, M., de Bakker, P.I., Veldink, J.H. and van den Berg, L.H., 2012b. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 21, 3776-84. 10.1093/hmg/dds199.
- van der Zee, J., Urwin, H., Engelborghs, S., Bruyland, M., Vandenberghe, R., Dermaut, B., De Pooter, T., Peeters, K., Santens, P., De Deyn, P.P., Fisher, E.M., Collinge, J., Isaacs, A.M. and Van Broeckhoven, C., 2008. CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Hum Mol Genet.* 17, 313-22. 10.1093/hmg/ddm309.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K.L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P.N., Blair, I.P., Nicholson, G., de Belleruche, J., Gallo, J.M., Miller, C.C. and Shaw, C.E., 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science.* 323, 1208-1211. 10.1126/science.1165942.
- Vanlandingham, P.A. and Ceresa, B.P., 2009. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem.* 284, 12110-24. 10.1074/jbc.M809277200.
- Vazquez, M.C., Ketzoian, C., Legnani, C., Rega, I., Sanchez, N., Perna, A., Penela, M., Aguirrezabal, X., Druet-Cabanac, M. and Medici, M., 2008. Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Uruguay: a population-based study. *Neuroepidemiology.* 30, 105-11. 10.1159/000120023.
- Vercelletto, M., Boutoleau-Bretonniere, C., Volteau, C., Puel, M., Auriacombe, S., Sarazin, M., Michel, B.F., Couratier, P., Thomas-Anterion, C., Verpillat, P., Gabelle, A., Golfier, V., Cerato, E., Lacomblez, L. and French research network on Frontotemporal, d., 2011. Memantine in behavioral variant frontotemporal dementia: negative results. *J Alzheimers Dis.* 23, 749-59. 10.3233/JAD-2010-101632.
- Vernay, A., Therreau, L., Blot, B., Risson, V., Dirrig-Grosch, S., Waegaert, R., Lequeu, T., Sellal, F., Schaeffer, L., Sadoul, R., Loeffler, J.P. and Rene, F., 2016. A transgenic mouse expressing CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet.* 25, 3341-3360. 10.1093/hmg/ddw182.
- Vidal, R.L., Figueroa, A., Court, F.A., Thielen, P., Molina, C., Wirth, C., Caballero, B., Kiffin, R., Segura-Aguilar, J., Cuervo, A.M., Glimcher, L.H. and Hetz, C., 2012. Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. *Hum Mol Genet.* 21, 2245-62. 10.1093/hmg/dds040.
- Vinceti, M., Bonvicini, F., Rothman, K.J., Vescovi, L. and Wang, F., 2010. The relation between amyotrophic lateral sclerosis and inorganic selenium in drinking water: a population-based case-control study. *Environ Health.* 9, 77. 10.1186/1476-069X-9-77.
- Vinceti, M., Solovyev, N., Mandrioli, J., Crespi, C.M., Bonvicini, F., Arcolin, E., Georgouloupoulou, E. and Michalke, B., 2013. Cerebrospinal fluid of newly diagnosed amyotrophic lateral sclerosis patients

exhibits abnormal levels of selenium species including elevated selenite. *Neurotoxicology*. 38, 25-32. 10.1016/j.neuro.2013.05.016.

von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.P., Cimbara, D.M., Scott, A., Krausslich, H.G., Kaplan, J., Morham, S.G. and Sundquist, W.I., 2003. The protein network of HIV budding. *Cell*. 114, 701-13.

Vucic, S. and Kiernan, M.C., 2007. Abnormalities in cortical and peripheral excitability in flail arm variant amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 78, 849-52. 10.1136/jnnp.2006.105056.

Waller, R., Goodall, E.F., Milo, M., Cooper-Knock, J., Da Costa, M., Hobson, E., Kazoka, M., Wollff, H., Heath, P.R., Shaw, P.J. and Kirby, J., 2017. Serum miRNAs miR-206, 143-3p and 374b-5p as potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neurobiol Aging*. 55, 123-131. 10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.027.

Wang, H.Y., Wang, I.F., Bose, J. and Shen, C.K., 2004. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics*. 83, 130-9.

Wang, I.F., Guo, B.S., Liu, Y.C., Wu, C.C., Yang, C.H., Tsai, K.J. and Shen, C.K., 2012. Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 15024-9. 10.1073/pnas.1206362109.

Wang, X., Ma, M., Teng, J., Che, X., Zhang, W., Feng, S., Zhou, S., Zhang, Y., Wu, E. and Ding, X., 2015. Valproate Attenuates 25-kDa C-Terminal Fragment of TDP-43-Induced Neuronal Toxicity via Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress and Activating Autophagy. *Int J Biol Sci*. 11, 752-61. 10.7150/ijbs.11880.

Wang, Y., Zhang, N., Zhang, L., Li, R., Fu, W., Ma, K., Li, X., Wang, L., Wang, J., Zhang, H., Gu, W., Zhu, W.G. and Zhao, Y., 2016. Autophagy Regulates Chromatin Ubiquitination in DNA Damage Response through Elimination of SQSTM1/p62. *Mol Cell*. 63, 34-48. 10.1016/j.molcel.2016.05.027.

Wang, Z., Miao, G., Xue, X., Guo, X., Yuan, C., Wang, Z., Zhang, G., Chen, Y., Feng, D., Hu, J. and Zhang, H., 2016. The Vici Syndrome Protein EPG5 Is a Rab7 Effector that Determines the Fusion Specificity of Autophagosomes with Late Endosomes/Lysosomes. *Mol Cell*. 63, 781-95. 10.1016/j.molcel.2016.08.021.

Wate, R., Ito, H., Zhang, J.H., Ohnishi, S., Nakano, S. and Kusaka, H., 2005. Expression of an endoplasmic reticulum-resident chaperone, glucose-regulated stress protein 78, in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 110, 557-62. 10.1007/s00401-005-1080-y.

Webster, C.P., Smith, E.F., Bauer, C.S., Moller, A., Hautbergue, G.M., Ferraiuolo, L., Myszczyńska, M.A., Higginbottom, A., Walsh, M.J., Whitworth, A.J., Kaspar, B.K., Meyer, K., Shaw, P.J., Grierson, A.J. and De Vos, K.J., 2016. The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. *EMBO J*. 35, 1656-76. 10.15252/embj.201694401.

Wei, Y., 2014. Autophagic induction of amyotrophic lateral sclerosis-linked Cu/Zn superoxide dismutase 1 G93A mutant in NSC34 cells. *Neural Regen Res*. 9, 16-24. 10.4103/1673-5374.125325.

West, R.J.H., Ugbode, C., Gao, F.B. and Sweeney, S.T., 2018. The pro-apoptotic JNK scaffold POSH/SH3RF1 mediates CHMP2B Intron5-associated toxicity in animal models of frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet*. 27, 1382-1395. 10.1093/hmg/ddy048.

Wijesekera, L.C. and Leigh, P.N., 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*. 4, 3. 10.1186/1750-1172-4-3.

Wilke, C., Preische, O., Deuschle, C., Roeben, B., Apel, A., Barro, C., Maia, L., Maetzler, W., Kuhle, J. and Synofzik, M., 2016. Neurofilament light chain in FTD is elevated not only in cerebrospinal fluid, but also in serum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 87, 1270-1272. 10.1136/jnnp-2015-312972.

- Winton, M.J., Igaz, L.M., Wong, M.M., Kwong, L.K., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M., 2008. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem.* 283, 13302-9. 10.1074/jbc.M800342200.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W. and Price, D.L., 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron.* 14, 1105-16.
- Wong, Y.C. and Holzbaur, E.L., 2014. Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, E4439-48. 10.1073/pnas.1405752111.
- Wooten, M.W., Geetha, T., Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Diaz-Meco, M.T. and Moscat, J., 2005. The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J Biol Chem.* 280, 35625-9. 10.1074/jbc.C500237200.
- Xia, Q., Wang, H., Hao, Z., Fu, C., Hu, Q., Gao, F., Ren, H., Chen, D., Han, J., Ying, Z. and Wang, G., 2016. TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion. *EMBO J.* 35, 121-42. 10.15252/embj.201591998.
- Xu, Z., Poidevin, M., Li, X., Li, Y., Shu, L., Nelson, D.L., Li, H., Hales, C.M., Gearing, M., Wingo, T.S. and Jin, P., 2013. Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 7778-83. 10.1073/pnas.1219643110.
- Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H. and Cleveland, D.W., 2008. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci.* 11, 251-3. 10.1038/nn2047.
- Yang, Y., Quach, C. and Liang, C., 2016a. Autophagy modulator plays a part in UV protection. *Autophagy.* 12, 1677-8. 10.1080/15548627.2016.1196319.
- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H.X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W.Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A.C., Cole, N., Gascon, G., Yagmour, A., Ben-Hamida, M., Pericak-Vance, M., Hentati, F. and Siddique, T., 2001. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 29, 160-5. 10.1038/ng1001-160.
- Yang, Y., He, S., Wang, Q., Li, F., Kwak, M.J., Chen, S., O'Connell, D., Zhang, T., Pirooz, S.D., Jeon, Y., Chimge, N.O., Frenkel, B., Choi, Y., Aldrovandi, G.M., Oh, B.H., Yuan, Z. and Liang, C., 2016b. Autophagic UVRAG Promotes UV-Induced Photolesion Repair by Activation of the CRL4(DDB2) E3 Ligase. *Mol Cell.* 62, 507-19. 10.1016/j.molcel.2016.04.014.
- Yen, W.L., Shintani, T., Nair, U., Cao, Y., Richardson, B.C., Li, Z., Hughson, F.M., Baba, M. and Klionsky, D.J., 2010. The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *J Cell Biol.* 188, 101-14. 10.1083/jcb.200904075.
- Yim, M.B., Kang, J.H., Yim, H.S., Kwak, H.S., Chock, P.B. and Stadtman, E.R., 1996. A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 5709-14.
- Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. and Eskelinen, E.L., 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 5, 1180-5.
- Yorimitsu, T., He, C., Wang, K. and Klionsky, D.J., 2009. Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy. *Autophagy.* 5, 616-24.

- Yu, Z., Gonciarz, M.D., Sundquist, W.I., Hill, C.P. and Jensen, G.J., 2008. Cryo-EM structure of dodecameric Vps4p and its 2:1 complex with Vta1p. *J Mol Biol.* 377, 364-77. 10.1016/j.jmb.2008.01.009.
- Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S.R., Popova, E., Palu, G. and Gottlinger, H., 2006. Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 19140-5. 10.1073/pnas.0603788103.
- Zarei, S., Carr, K., Reiley, L., Diaz, K., Guerra, O., Altamirano, P.F., Pagani, W., Lodin, D., Orozco, G. and Chinea, A., 2015. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int.* 6, 171. 10.4103/2152-7806.169561.
- Zhang, S., Salemi, J., Hou, H., Zhu, Y., Mori, T., Giunta, B., Obregon, D. and Tan, J., 2010. Rapamycin promotes beta-amyloid production via ADAM-10 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 398, 337-41. 10.1016/j.bbrc.2010.06.017.
- Zhang, Y., Schmid, B., Nikolaisen, N.K., Rasmussen, M.A., Aldana, B.I., Agger, M., Calloe, K., Stummann, T.C., Larsen, H.M., Nielsen, T.T., Huang, J., Xu, F., Liu, X., Bolund, L., Meyer, M., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., Luo, Y., Nielsen, J.E., Consortium, F.R., Holst, B., Clausen, C., Hyttel, P. and Freude, K.K., 2017. Patient iPSC-Derived Neurons for Disease Modeling of Frontotemporal Dementia with Mutation in CHMP2B. *Stem Cell Reports.* 8, 648-658. 10.1016/j.stemcr.2017.01.012.
- Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N. and Yue, Z., 2009. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol.* 11, 468-76. 10.1038/ncb1854.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J. and Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 108, 1167-74. 10.1172/JCI13505.
- Zhou, X., Sun, L., Brady, O.A., Murphy, K.A. and Hu, F., 2017. Elevated TMEM106B levels exaggerate lipofuscin accumulation and lysosomal dysfunction in aged mice with progranulin deficiency. *Acta Neuropathol Commun.* 5, 9. 10.1186/s40478-017-0412-1.
- Zhu, J., Nathan, C., Jin, W., Sim, D., Ashcroft, G.S., Wahl, S.M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wright, C.D. and Ding, A., 2002. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell.* 111, 867-78.
- Zhu, Y.P., Brown, J.R., Sag, D., Zhang, L. and Suttles, J., 2015. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates IL-10-mediated anti-inflammatory signaling pathways in macrophages. *J Immunol.* 194, 584-94. 10.4049/jimmunol.1401024.
- Zoccolella, S., Beghi, E., Palagano, G., Fraddosio, A., Guerra, V., Samarelli, V., Lepore, V., Simone, I.L., Lamberti, P., Serlenga, L., Logroscino, G. and registry, S., 2007. Riluzole and amyotrophic lateral sclerosis survival: a population-based study in southern Italy. *Eur J Neurol.* 14, 262-8. 10.1111/j.1468-1331.2006.01575.x.

# Annexes

## Annexes

### I. Données supplémentaires de la publication 1

Gene Symbol	Definition	Fold Change	Adjusted p-value
<i>Itgax</i>	Integrin Alpha X	5.02	2.17e-24
<i>Ccl4</i>	Chemokine (C-C Motif) Ligand 4	4.60	1.23e-22
<i>Pdcd1</i>	Programmed Cell Death 1	4.37	2.53e-21
<i>Ccl3</i>	Chemokine (C-C Motif) Ligand 3	3.82	2.27e-16
<i>Lgals3</i>	Lectin, Galactose Binding, Soluble 3	3.39	3.85e-23
<i>Trem2</i>	Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2	3.08	2.64e-27
<i>Clec7a</i>	C-Type Lectin Domain Family 7, Member A	3.07	1.62e-13
<i>Arl11</i>	Adp-Ribosylation Factor-Like 11	2.85	1.94e-15
<i>Cst7</i>	Cystatin F (Leukocystatin)	2.84	8.27e-10
<i>Cd68</i>	Cd68 Antigen	2.77	2.31e-24
<i>Serpinf2</i>	Serine (Or Cysteine) Peptidase Inhibitor, Clade F, Member 2	2.57	5.70e-08
<i>Mpeg1</i>	Macrophage Expressed Gene 1	2.57	4.17e-13
<i>Tgm1</i>	Transglutaminase 1, K Polypeptide	2.54	8.10e-08
<i>Ptx3</i>	Pentraxin Related Gene	2.47	4.17e-13
<i>Tyrobp</i>	Tyro Protein Tyrosine Kinase Binding Protein	2.42	3.65e-13
<i>C4b</i>	Complement Component 4B (Chido Blood Group)	2.39	2.72e-21
<i>Thy1</i>	Thymus Cell Antigen 1, Theta	2.39	2.49e-27
<i>C1qa</i>	Complement Component 1, Q Subcomponent, Alpha Polypeptide	2.38	4.74e-10
<i>AF251705</i>	Cdna Sequence Af251705	2.36	8.63e-18
<i>Rgs1</i>	Regulator Of G-Protein Signaling 1	2.35	1.42e-06
<i>Apoc1</i>	Apolipoprotein C-I	2.34	4.58e-10
<i>Timp1</i>	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase 1	2.32	1.17e-07
<i>Gpnmb</i>	Glycoprotein (Transmembrane) Nmb	2.30	1.96e-06
<i>C1qc</i>	Complement Component 1, Q Subcomponent, C Chain	2.28	9.84e-10
<i>Ccl6</i>	Chemokine (C-C Motif) Ligand 6	2.23	7.34e-10
<i>C1qb</i>	Complement Component 1, Q Subcomponent, Beta Polypeptide	2.21	1.65e-12
<i>Aspg</i>	Asparaginase Homolog (S. Cerevisiae)	2.19	1.67e-08
<i>Slc11a1</i>	Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporters), Member 1	2.16	3.65e-19
<i>Lag3</i>	Lymphocyte-Activation Gene 3	2.16	8.35e-09
<i>Mmp12</i>	Matrix Metalloproteinase 12	2.09	2.73e-05
<i>Endou</i>	Endonuclease, Polyu-Specific	2.07	1.31e-12
<i>Slc15a3</i>	Solute Carrier Family 15, Member 3	2.06	1.04e-09
<i>Csf3r</i>	Colony Stimulating Factor 3 Receptor (Granulocyte)	2.05	4.31e-12

<i>A330015K06Rik</i>	Riken Cdna A330015K06 Gene	2.03	2.34e-08
<i>Gfap</i>	Glial Fibrillary Acidic Protein	2.02	2.53e-21
<i>Cd180</i>	Cd180 Antigen	2.02	1.12e-06
<i>Tlr2</i>	Toll-Like Receptor 2	2.02	1.99e-12
<i>C3ar1</i>	Complement Component 3A Receptor 1	2.01	5.66e-06
<i>Atf3</i>	Activating Transcription Factor 3	2.00	1.60e-07
<i>Naip5</i>	Nlr Family, Apoptosis Inhibitory Protein 5	1.98	1.09e-09
<i>Bcl2a1b</i>	B Cell Leukemia/Lymphoma 2 Related Protein A1B	1.98	6.56e-05
<i>Cd109</i>	Cd109 Antigen	1.97	2.98e-07
<i>Glycam1</i>	Glycosylation Dependent Cell Adhesion Molecule 1	1.97	4.01e-04
<i>Cd84</i>	Cd84 Antigen	1.96	2.02e-06
<i>Gpr179</i>	G Protein-Coupled Receptor 179	1.94	3.59e-07
<i>Fcer1g</i>	Fc Receptor, Ige, High Affinity I, Gamma Polypeptide	1.93	1.58e-07
<i>Ctss</i>	Cathepsin S	1.92	2.19e-08
<i>Havcr2</i>	Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2	1.91	2.76e-07
<i>Lpl</i>	Lipoprotein Lipase	1.90	1.99e-04
<i>Batf3</i>	Basic Leucine Zipper Transcription Factor, Atf-Like 3	1.90	2.60e-04
<i>P2ry6</i>	Pyrimidinergic Receptor P2Y, G-Protein Coupled, 6	1.89	2.93e-09
<i>Fcrls</i>	Fc Receptor-Like S, Scavenger Receptor	1.88	1.02e-05
<i>Padi1</i>	Peptidyl Arginine Deiminase, Type I	1.87	1.34e-03
<i>Fcgr3</i>	Fc Receptor, Igg, Low Affinity III	1.87	2.69e-07
<i>Hvcn1</i>	Hydrogen Voltage-Gated Channel 1	1.86	5.17e-06
<i>Crym</i>	Crystallin, Mu	1.86	1.47e-03
<i>Hcar2</i>	Hydroxycarboxylic Acid Receptor 2	1.86	9.64e-04
<i>H2-Ob</i>	Histocompatibility 2, O Region Beta Locus	1.85	1.15e-06
<i>Myo1f</i>	Myosin If	1.82	1.42e-06
<i>Irf8</i>	Interferon Regulatory Factor 8	1.81	1.48e-06
<i>C3</i>	Complement Component 3	1.80	1.46e-09
<i>Cd52</i>	Cd52 Antigen	1.80	5.73e-04
<i>Abcc3</i>	Atp-Binding Cassette, Sub-Family C (Cftr/Mrp), Member 3	1.79	4.48e-08
<i>Rasal3</i>	Ras Protein Activator Like 3	1.79	7.40e-07
<i>Slamf8</i>	Slam Family Member 8	1.78	2.83e-03
<i>Gm13904</i>	Predicted Gene 13904	1.77	6.45e-04
<i>Dusp27</i>	Dual Specificity Phosphatase 27 (Putative)	1.77	4.30e-03
<i>Klrb1b</i>	Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily B Member 1B	1.77	3.64e-03
<i>Crlf1</i>	Cytokine Receptor-Like Factor 1	1.76	1.88e-03
<i>Flnc</i>	Filamin C, Gamma	1.76	6.57e-09
<i>Plau</i>	Plasminogen Activator, Urokinase	1.76	1.35e-06
<i>Hsd17b3</i>	Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenase 3	1.75	3.22e-03



<i>ApoE</i>	Apolipoprotein E	1.75	1.99e-04
<i>Ptafr</i>	Platelet-Activating Factor Receptor	1.75	5.06e-08
<i>Cd300lb</i>	Cd300 Antigen Like Family Member B	1.74	5.34e-03
<i>Tnfsf8</i>	Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 8	1.74	3.94e-03
<i>Gna15</i>	Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha 15	1.73	3.64e-04
<i>Pld4</i>	Phospholipase D Family, Member 4	1.73	1.67e-08
<i>Gipr</i>	Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor	1.73	2.57e-04
<i>Cd48</i>	Cd48 Antigen	1.72	4.57e-04
<i>Blnk</i>	B Cell Linker	1.72	1.27e-05
<i>Gm11681</i>	Predicted Gene 11681	1.72	7.57e-06
<i>Pdlim4</i>	Pdz And Lim Domain 4	1.72	5.52e-04
<i>Cd14</i>	Cd14 Antigen	1.71	1.29e-05
<i>Il1rn</i>	Interleukin 1 Receptor Antagonist	1.71	6.29e-03
<i>Cartpt</i>	Cart Prepropeptide	1.71	1.13e-03
<i>Prrx2</i>	Paired Related Homeobox 2	1.71	4.58e-04
<i>Tnfaip8l2</i>	Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 8-Like 2	1.70	4.24e-05
<i>Naip6</i>	Nlr Family, Apoptosis Inhibitory Protein 6	1.70	2.83e-03
<i>BC089491</i>	Cdna Sequence Bc089491	1.69	7.96e-03
<i>Hpgds</i>	Hematopoietic Prostaglandin D Synthase	1.69	9.44e-08
<i>Stra6l</i>	Stra6-Like	1.69	2.82e-03
<i>Laptm5</i>	Lysosomal-Associated Protein Transmembrane 5	1.68	5.43e-07
<i>Ly9</i>	Lymphocyte Antigen 9	1.68	1.17e-03
<i>Sprr1a</i>	Small Proline-Rich Protein 1A	1.68	6.70e-03
<i>Naip2</i>	Nlr Family, Apoptosis Inhibitory Protein 2	1.67	1.99e-04
<i>Gpr84</i>	G Protein-Coupled Receptor 84	1.66	1.24e-02
<i>Tprg</i>	Transformation Related Protein 63 Regulated	1.66	5.73e-03
<i>Cyba</i>	Cytochrome B-245, Alpha Polypeptide	1.65	7.32e-03
<i>Gm8186</i>	Predicted Gene 8186	1.65	1.96e-02
<i>Gm15650</i>	Predicted Gene 15650	1.65	1.59e-02
<i>Lrrc17</i>	Leucine Rich Repeat Containing 17	1.64	2.13e-02
<i>Bcl3</i>	B Cell Leukemia/Lymphoma 3	1.64	1.24e-02
<i>Sspo</i>	Sco-Spondin	1.64	1.30e-03
<i>Aif1</i>	Allograft Inflammatory Factor 1	1.64	5.23e-06
<i>Cd63-ps</i>	Cd63 Antigen, Pseudogene	1.64	7.60e-04
<i>1810062O18Rik</i>	Riken Cdna 1810062O18 Gene	1.64	3.52e-03
<i>Itgb2</i>	Integrin Beta 2	1.63	3.29e-04
<i>RP24-68G17.3</i>		1.63	2.58e-03
<i>A330048O09Rik</i>	Riken Cdna A330048O09 Gene	1.63	4.60e-05
<i>AU020206</i>	Expressed Sequence Au020206	1.62	2.48e-04
<i>Gm13868</i>	Predicted Gene 13868	1.62	2.75e-02

<i>Siglecf</i>	Sialic Acid Binding Ig-Like Lectin F	1.62	2.20e-02
<i>Gm14964</i>	Predicted Gene 14964	1.62	1.66e-02
<i>Gm37861</i>	Predicted Gene, 37861	1.61	2.27e-02
<i>Hspb1</i>	Heat Shock Protein 1	1.61	3.30e-03
<i>Ip6k3</i>	Inositol Hexaphosphate Kinase 3	1.61	1.21e-04
<i>Sap30bpos</i>	Sap30 Binding Protein, Opposite Strand	1.61	6.29e-03
<i>Ccdc36</i>	Coiled-Coil Domain Containing 36	1.61	2.91e-02
<i>Spata9</i>	Spermatogenesis Associated 9	1.61	1.52e-02
<i>Il1a</i>	Interleukin 1 Alpha	1.61	2.63e-02
<i>Zfp185</i>	Zinc Finger Protein 185	1.61	2.61e-03
<i>Cd22</i>	Cd22 Antigen	1.61	1.84e-02
<i>1700095J03Rik</i>	Riken Cdna 1700095J03 Gene	1.61	2.47e-03
<i>Dcstamp</i>	Dendrocyte Expressed Seven Transmembrane Protein	1.60	3.33e-02
<i>Gm12057</i>	Predicted Gene 12057	1.60	2.65e-02
<i>Slc4a5</i>	Solute Carrier Family 4, Sodium Bicarbonate Cotransporter, Member 5	1.60	2.39e-04
<i>RP24-496C22.5</i>		1.60	3.24e-02
<i>Gm16555</i>	Predicted Gene 16555	1.60	2.72e-02
<i>Fgr</i>	Gardner-Rasheed Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog	1.59	1.88e-02
<i>Ecell1</i>	Endothelin Converting Enzyme-Like 1	1.59	3.42e-05
<i>H2-Oa</i>	Histocompatibility 2, O Region Alpha Locus	1.59	3.37e-02
<i>Gm13306</i>	Predicted Gene 13306	1.59	2.15e-02
<i>Cd72</i>	Cd72 Antigen	1.59	2.11e-02
<i>Spata3</i>	Spermatogenesis Associated 3	1.59	3.19e-02
<i>Tmprss7</i>	Transmembrane Serine Protease 7	1.58	2.65e-02
<i>Ctsd</i>	Cathepsin D	1.58	1.21e-11
<i>Trhr2</i>	Thyrotropin Releasing Hormone Receptor 2	1.58	7.78e-03
<i>Lat2</i>	Linker For Activation Of T Cells Family, Member 2	1.58	2.18e-05
<i>Kcnmb4</i>	Potassium Large Conductance Calcium-Activated Channel, Subfamily M, Beta Member 4	1.58	2.73e-03
<i>Ucn</i>	Urocortin	1.57	3.44e-02
<i>Cd44</i>	Cd44 Antigen	1.57	2.68e-03
<i>Uts2</i>	Urotensin 2	1.57	2.45e-02
<i>Csflr</i>	Colony Stimulating Factor 1 Receptor	1.57	1.41e-10
<i>Sall4</i>	Sal-Like 4 (Drosophila)	1.57	3.68e-02
<i>Cyth4</i>	Cytohesin 4	1.57	1.45e-06
<i>Rapgef3os2</i>	Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor (Gef) 3, Opposite Strand 2	1.57	3.11e-02
<i>Irf5</i>	Interferon Regulatory Factor 5	1.57	3.89e-05
<i>Gm21846</i>	Predicted Gene, 21846	1.57	3.73e-02
<i>Mrgprf</i>	Mas-Related Gpr, Member F	1.56	1.23e-02
<i>Nnat</i>	Neuronatin	1.56	2.26e-02

<i>C4a</i>	Complement Component 4A (Rodgers Blood Group)	1.56	1.49e-03
<i>Irs3</i>	Insulin Receptor Substrate 3	1.56	3.17e-02
<i>Gpr183</i>	G Protein-Coupled Receptor 183	1.56	1.33e-03
<i>Wisp2</i>	Wnt1 Inducible Signaling Pathway Protein 2	1.56	4.87e-02
<i>Gm16102</i>	Predicted Gene 16102	1.56	4.54e-02
<i>Agt</i>	Angiotensinogen (Serpine Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 8)	1.56	7.72e-03
<i>Pnoc</i>	Prepronociceptin	1.56	4.28e-03
<i>A2m</i>	Alpha-2-Macroglobulin	1.55	5.16e-05
<i>Fxyd1</i>	Fxyd Domain-Containing Ion Transport Regulator 1	1.55	4.55e-03
<i>Gm37811</i>	Predicted Gene, 37811	1.55	1.13e-02
<i>Kcns1</i>	K <sup>+</sup> Voltage-Gated Channel, Subfamily S, 1	1.55	1.19e-03
<i>Ctsz</i>	Cathepsin Z	1.55	1.10e-08
<i>Uts2b</i>	Urotensin 2B	1.55	3.15e-02
<i>Tmie</i>	Transmembrane Inner Ear	1.54	1.73e-09
<i>Cnksr1</i>	Connector Enhancer Of Kinase Suppressor Of Ras 1	1.54	3.05e-02
<i>Cryba4</i>	Crystallin, Beta A4	1.54	4.95e-02
<i>Tifab</i>	Traf-Interacting Protein With Forkhead-Associated Domain, Family Member B	1.54	5.73e-04
<i>Cd37</i>	Cd37 Antigen	1.54	5.46e-03
<i>Vgf</i>	Vgf Nerve Growth Factor Inducible	1.54	2.94e-02
<i>Pitx2</i>	Paired-Like Homeodomain Transcription Factor 2	1.54	4.30e-02
<i>Nckap1l</i>	Nck Associated Protein 1 Like	1.54	3.84e-06
<i>Gm37706</i>	Predicted Gene, 37706	1.54	4.28e-02
<i>Ticam2</i>	Toll-Like Receptor Adaptor Molecule 2	1.54	3.16e-02
<i>C1ql1</i>	Complement Component 1, Q Subcomponent-Like 1	1.54	1.41e-02
<i>Tm4sf5</i>	Transmembrane 4 Superfamily Member 5	1.53	4.17e-02
<i>Hk2</i>	Hexokinase 2	1.53	7.19e-04
<i>Parvg</i>	Parvin, Gamma	1.53	3.47e-07
<i>Calcb</i>	Calcitonin-Related Polypeptide, Beta	1.53	5.83e-03
<i>Unc93b1</i>	Unc-93 Homolog B1 (C. Elegans)	1.53	3.24e-03
<i>Plb1</i>	Phospholipase B1	1.53	3.79e-02
<i>Ly86</i>	Lymphocyte Antigen 86	1.53	3.09e-02
<i>Cx3cr1</i>	Chemokine (C-X3-C Motif) Receptor 1	1.53	5.66e-06
<i>Lyz2</i>	Lysozyme 2	1.52	1.15e-02
<i>A530076I17Rik</i>	Riken Cdna A530076I17 Gene	1.52	3.20e-02
<i>Slc14a1</i>	Solute Carrier Family 14 (Urea Transporter), Member 1	1.52	9.88e-07
<i>Hexb</i>	Hexosaminidase B	1.52	2.41e-06
<i>Slamf9</i>	Slam Family Member 9	1.52	1.69e-02
<i>RP23-286M3.4</i>		1.52	4.25e-02
<i>Kcnh4</i>	Potassium Voltage-Gated Channel, Subfamily H (Eag-Related), Member 4	1.52	1.45e-02

<i>Rarres1</i>	Retinoic Acid Receptor Responder (Tazarotene Induced) 1	1.51	6.37e-05
<i>Fyb</i>	Fyn Binding Protein	1.51	1.16e-03
<i>Mnx1</i>	Motor Neuron And Pancreas Homeobox 1	1.51	9.75e-03
<i>Pamr1</i>	Peptidase Domain Containing Associated With Muscle Regeneration 1	1.51	3.11e-06
<i>Fam198a</i>	Family With Sequence Similarity 198, Member A	1.51	3.83e-04
<i>Tnfrsf1a</i>	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1A	1.51	1.75e-06
<i>Fcgr1</i>	Fc Receptor, Igg, High Affinity I	1.51	3.58e-04
<i>Fam179a</i>	Family With Sequence Similarity 179, Member A	1.50	2.56e-04
<i>Nme2</i>	Nme/Nm23 Nucleoside Diphosphate Kinase 2	1.50	1.58e-02
<i>Syce2</i>	Synaptonemal Complex Central Element Protein 2	1.50	4.80e-03
<i>Rprm</i>	Reprimo, Tp53 Dependent G2 Arrest Mediator Candidate	1.50	1.11e-02
<i>Gimap4</i>	Gtpase, Imap Family Member 4	0.67	2.94e-02
<i>Gm21798</i>	Predicted Gene, 21798	0.66	4.31e-02
<i>Gm25047</i>	Predicted Gene, 25047	0.66	4.28e-02
<i>Gas2l3</i>	Growth Arrest-Specific 2 Like 3	0.66	3.29e-02
<i>Idi1</i>	Isopentenyl-Diphosphate Delta Isomerase	0.66	2.25e-04
<i>Elovl2</i>	Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids (Fen1/Elo2, Sur4/Elo3, Yeast)-Like 2	0.66	4.19e-07
<i>Aspn</i>	Asporin	0.66	2.51e-02
<i>Hmgcs1</i>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Synthase 1	0.66	7.36e-06
<i>Olf287</i>	Olfactory Receptor 287	0.66	5.96e-09
<i>Gm21984</i>	Predicted Gene 21984	0.65	2.00e-02
<i>Cubn</i>	Cubilin (Intrinsic Factor-Cobalamin Receptor)	0.65	1.97e-03
<i>Gm33366</i>	Predicted Gene, 33366	0.65	1.82e-02
<i>Fam227b</i>	Family With Sequence Similarity 227, Member B	0.65	2.11e-02
<i>Gpd1</i>	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1 (Soluble)	0.65	1.58e-07
<i>Gm37111</i>	Predicted Gene, 37111	0.65	3.66e-03
<i>Slc6a5</i>	Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter, Glycine), Member 5	0.65	5.02e-07
<i>Sgpp2</i>	Sphingosine-1-Phosphate Phosphatase 2	0.65	8.10e-08
<i>Ugt8a</i>	Udp Galactosyltransferase 8A	0.65	3.11e-03
<i>Lgi2</i>	Leucine-Rich Repeat Lgi Family, Member 2	0.65	1.78e-08
<i>Nat8</i>	N-Acetyltransferase 8 (Gcn5-Related, Putative)	0.65	1.88e-03
<i>Hn1l</i>	Hematological And Neurological Expressed 1-Like	0.65	9.26e-06
<i>Lipg</i>	Lipase, Endothelial	0.64	4.50e-02
<i>Gm14113</i>	Predicted Gene 14113	0.64	2.30e-02
<i>RP23-240E15.3</i>		0.64	9.00e-03
<i>Gm26633</i>	Predicted Gene, 26633	0.64	1.71e-04
<i>Akr1c14</i>	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member C14	0.64	1.53e-02

<i>Ibsp</i>	Integrin Binding Sialoprotein	0.63	1.24e-02
<i>RP23-186B18.8</i>		0.63	1.34e-03
<i>4933415A04Rik</i>	Riken Cdna 4933415A04 Gene	0.63	1.89e-03
<i>Gm26673</i>	Predicted Gene, 26673	0.63	8.62e-08
<i>Strip2</i>	Striatin Interacting Protein 2	0.63	4.91e-07
<i>Six4</i>	Sine Oculis-Related Homeobox 4	0.63	4.45e-04
<i>Nkx2-2os</i>	Nk2 Homeobox 2, Opposite Strand	0.63	3.50e-02
<i>Kcnc3</i>	Potassium Voltage Gated Channel, Shaw-Related Subfamily, Member 3	0.63	1.33e-09
<i>Gm2115</i>	Predicted Gene 2115	0.63	9.99e-11
<i>Tecrl</i>	Trans-2,3-Enoyl-Coa Reductase-Like	0.63	2.13e-02
<i>Nlrp5-ps</i>	Nlr Family, Pyrin Domain Containing 5, Pseudogene	0.62	2.56e-03
<i>Dkk1</i>	Dickkopf Homolog 1 (Xenopus Laevis)	0.62	2.63e-02
<i>Sptssb</i>	Serine Palmitoyltransferase, Small Subunit B	0.62	5.60e-08
<i>Steap2</i>	Six Transmembrane Epithelial Antigen Of Prostate 2	0.62	1.78e-08
<i>Ccnj1</i>	Cyclin J-Like	0.62	1.00e-05
<i>1700008O03Rik</i>	Riken Cdna 1700008O03 Gene	0.62	3.34e-06
<i>Enpp3</i>	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3	0.62	1.63e-03
<i>Cxcl9</i>	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 9	0.61	1.05e-02
<i>Gpr50</i>	G-Protein-Coupled Receptor 50	0.61	2.29e-03
<i>Gm10364</i>	Predicted Pseudogene 10364	0.61	1.52e-02
<i>5031414D18Rik</i>	Riken Cdna 5031414D18 Gene	0.61	2.73e-08
<i>Fmo2</i>	Flavin Containing Monooxygenase 2	0.61	1.19e-02
<i>Gnptab</i>	N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase, Alpha And Beta Subunits	0.60	7.73e-07
<i>Fbxo40</i>	F-Box Protein 40	0.60	4.16e-05
<i>Epn3</i>	Epsin 3	0.60	2.66e-05
<i>Fam78a</i>	Family With Sequence Similarity 78, Member A	0.60	9.59e-08
<i>Acan</i>	Aggrecan	0.60	5.40e-13
<i>Gm38103</i>	Predicted Gene, 38103	0.59	3.62e-04
<i>Gm4524</i>	Predicted Gene 4524	0.59	9.87e-06
<i>Kirrel2</i>	Kin Of Irre Like 2 (Drosophila)	0.59	4.53e-03
<i>Zbtb16</i>	Zinc Finger And Btb Domain Containing 16	0.59	9.75e-03
<i>RP23-354E8.1</i>		0.58	9.75e-03
<i>Pla2g3</i>	Phospholipase A2, Group Iii	0.58	9.40e-05
<i>4930432E11Rik</i>	Riken Cdna 4930432E11 Gene	0.56	1.22e-03
<i>Scn4b</i>	Sodium Channel, Type Iv, Beta	0.56	2.91e-19
<i>Hoxa13</i>	Homeobox A13	0.56	3.01e-03
<i>Hsd11b1</i>	Hydroxysteroid 11-Beta Dehydrogenase 1	0.55	2.87e-10
<i>Apln</i>	Apelin	0.55	1.67e-20
<i>Ptprq</i>	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, Q	0.55	1.06e-03
<i>Sycp2l</i>	Synaptonemal Complex Protein 2-Like	0.54	4.51e-04

<i>Smyd1</i>	Set And Mynd Domain Containing 1	0.53	1.35e-05
<i>Gm15512</i>	Predicted Gene 15512	0.53	3.33e-05
<i>Mir7688</i>	Microrna 7688	0.53	1.14e-04
<i>Dio2</i>	Deiodinase, Iodothyronine, Type Ii	0.50	1.74e-06
<i>Gm36947</i>	Predicted Gene, 36947	0.50	1.03e-04
<i>Hapln1</i>	Hyaluronan And Proteoglycan Link Protein 1	0.50	1.92e-09
<i>Calcoco2</i>	Calcium Binding And Coiled-Coil Domain 2	0.48	3.23e-05
<i>Dmrta1</i>	Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor Like Family A1	0.48	2.44e-05
<i>Atp2b1</i>	Atpase, Ca <sup>++</sup> Transporting, Plasma Membrane 1	0.46	1.10e-20
<i>Aqp6</i>	Aquaporin 6	0.45	1.56e-09
<i>Gm10684</i>	Predicted Gene 10684	0.44	1.64e-08
<i>A730020M07Rik</i>	Riken Cdna A730020M07 Gene	0.37	1.27e-12
<i>Mybpc3</i>	Myosin Binding Protein C, Cardiac	0.27	3.53e-19
<i>Chrna2</i>	Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha Polypeptide 2 (Neuronal)	0.26	6.55e-35

**Supplementary table 2** : Genes with altered expression in CHMP2B<sup>intron5</sup> mice compared to non-transgenic littermates at asymptomatic stage. Genes were selected as follow: adjusted *p*-value <0.05; FC<0.67 or >1.5.



<b>Gene Symbol</b>	<b>Definition</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Adjusted p-value</b>
<i>Avil</i>	Advillin	4.71	7.77e-28
<i>Pirt</i>	Phosphoinositide-Interacting Regulator Of Transient Receptor Potential Channels	4.36	9.37e-23
<i>Tusc5</i>	Tumor Suppressor Candidate 5	4.27	1.59e-22
<i>Fxyd2</i>	Fxyd Domain-Containing Ion Transport Regulator 2	3.75	5.78e-19
<i>Scn11a</i>	Sodium Channel, Voltage-Gated, Type Xi, Alpha	3.51	7.51e-26
<i>Trpv1</i>	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily V, Member 1	3.46	5.53e-15
<i>Slc17a7</i>	Solute Carrier Family 17 (Sodium-Dependent Inorganic Phosphate Cotransporter), Member 7	3.42	3.80e-23
<i>Ntrk1</i>	Neurotrophic Tyrosine Kinase, Receptor, Type 1	3.36	6.87e-18
<i>Acpp</i>	Acid Phosphatase, Prostate	3.32	2.85e-15
<i>Ppp1r1c</i>	Protein Phosphatase 1, Regulatory (Inhibitor) Subunit 1C	2.98	3.75e-12
<i>Prdm12</i>	Pr Domain Containing 12	2.95	4.30e-21
<i>Tmem45b</i>	Transmembrane Protein 45B	2.95	1.27e-18
<i>Tmem79</i>	Transmembrane Protein 79	2.88	1.05e-10
<i>Lpar3</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 3	2.86	2.80e-10
<i>Gfra3</i>	Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor Family Receptor Alpha 3	2.84	2.80e-10
<i>Asic3</i>	Acid-Sensing (Proton-Gated) Ion Channel 3	2.75	3.05e-09
<i>A3galt2</i>	Alpha 1,3-Galactosyltransferase 2 (Isoglobotriaosylceramide Synthase)	2.71	6.23e-09
<i>Trappc3l</i>	Trafficking Protein Particle Complex 3 Like	2.63	9.84e-13
<i>Ptgir</i>	Prostaglandin I Receptor (Ip)	2.56	2.66e-08
<i>Trpm8</i>	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily M, Member 8	2.50	1.83e-10
<i>Mmp25</i>	Matrix Metalloproteinase 25	2.47	7.53e-08
<i>Six1</i>	Sine Oculis-Related Homeobox 1	2.45	5.01e-10
<i>Amigo3</i>	Adhesion Molecule With Ig Like Domain 3	2.44	3.13e-07
<i>C4b</i>	Complement Component 4B (Chido Blood Group)	2.42	2.02e-18
<i>Tmem72</i>	Transmembrane Protein 72	2.39	1.40e-09
<i>Fam89a</i>	Family With Sequence Similarity 89, Member A	2.39	3.83e-07
<i>Ctxn3</i>	Cortexin 3	2.38	3.33e-09
<i>Pou4f3</i>	Pou Domain, Class 4, Transcription Factor 3	2.36	8.53e-07
<i>Gm7271</i>	Predicted Gene 7271	2.35	5.33e-08
<i>Nmb</i>	Neuromedin B	2.31	1.15e-07
<i>Fam19a3</i>	Family With Sequence Similarity 19, Member A3	2.30	1.48e-06
<i>P2rx3</i>	Purinergic Receptor P2X, Ligand-Gated Ion Channel, 3	2.27	3.45e-06
<i>Isl1</i>	Isl1 Transcription Factor, Lim/Homeodomain	2.24	3.40e-07
<i>Mrgprd</i>	Mas-Related Gpr, Member D	2.23	3.82e-15
<i>Isl2</i>	Insulin Related Protein 2 (Islet 2)	2.17	1.29e-05

<i>Slc7a7</i>	Solute Carrier Family 7 (Cationic Amino Acid Transporter, Y+ System), Member 7	2.16	3.43e-06
<i>Scn10a</i>	Sodium Channel, Voltage-Gated, Type X, Alpha	2.15	3.89e-15
<i>Dok4</i>	Docking Protein 4	2.13	7.65e-06
<i>Apoc1</i>	Apolipoprotein C-I	2.12	3.50e-07
<i>Calca</i>	Calcitonin/Calcitonin-Related Polypeptide, Alpha	2.10	8.14e-06
<i>Ppm1j</i>	Protein Phosphatase 1J	2.08	5.52e-05
<i>Aqp1</i>	Aquaporin 1	2.07	4.97e-05
<i>Ppef1</i>	Protein Phosphatase With Ef Hand Calcium-Binding Domain 1	2.06	5.92e-05
<i>Gpr35</i>	G Protein-Coupled Receptor 35	2.06	8.63e-06
<i>Dnah14</i>	Dynein, Axonemal, Heavy Chain 14	2.06	5.06e-05
<i>Baiap2l1</i>	Bai1-Associated Protein 2-Like 1	2.05	8.49e-05
<i>Ptgdr</i>	Prostaglandin D Receptor	2.05	3.63e-05
<i>Scn9a</i>	Sodium Channel, Voltage-Gated, Type Ix, Alpha	2.04	2.58e-05
<i>Crip3</i>	Cysteine-Rich Protein 3	2.03	1.08e-07
<i>Chrna6</i>	Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha Polypeptide 6	2.03	3.11e-05
<i>Fam150b</i>	Family With Sequence Similarity 150, Member B	2.02	1.29e-04
<i>Tmem233</i>	Transmembrane Protein 233	2.01	1.37e-12
<i>Slc39a2</i>	Solute Carrier Family 39 (Zinc Transporter), Member 2	1.99	2.29e-10
<i>Cdk15</i>	Cyclin-Dependent Kinase 15	1.98	5.38e-05
<i>C4a</i>	Complement Component 4A (Rodgers Blood Group)	1.97	3.13e-07
<i>Syt13</i>	Synaptotagmin-Like 3	1.96	3.04e-04
<i>Hsd17b3</i>	Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenase 3	1.94	2.50e-04
<i>Gad11</i>	Glutamate Decarboxylase-Like 1	1.93	2.18e-04
<i>Wisp2</i>	Wnt1 Inducible Signaling Pathway Protein 2	1.93	3.05e-04
<i>Card14</i>	Caspase Recruitment Domain Family, Member 14	1.92	9.62e-05
<i>D930028M14Rik</i>	Riken Cdna D930028M14 Gene	1.92	4.05e-04
<i>Serinc2</i>	Serine Incorporator 2	1.92	1.56e-04
<i>Nptx2</i>	Neuronal Pentraxin 2	1.92	5.93e-06
<i>Trpa1</i>	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily A, Member 1	1.91	4.76e-04
<i>Vill</i>	Villin-Like	1.91	6.72e-06
<i>Piezo2</i>	Piezo-Type Mechanosensitive Ion Channel Component 2	1.90	3.34e-04
<i>Lgals3</i>	Lectin, Galactose Binding, Soluble 3	1.89	1.26e-05
<i>Ngfr</i>	Nerve Growth Factor Receptor (Tnfr Superfamily, Member 16)	1.89	6.58e-04
<i>Tagln2</i>	Transgelin 2	1.89	1.46e-06
<i>Ccdc68</i>	Coiled-Coil Domain Containing 68	1.88	6.09e-04
<i>Ovgp1</i>	Oviductal Glycoprotein 1	1.88	6.17e-07
<i>Gm11549</i>	Predicted Gene 11549	1.87	6.51e-04
<i>Otoa</i>	Otoancorin	1.87	7.04e-04



<i>Prph</i>	Peripherin	1.86	3.02e-04
<i>Gm16551</i>	Predicted Gene 16551	1.85	2.85e-04
<i>Wnt6</i>	Wingless-Type Mmtv Integration Site Family, Member 6	1.85	4.24e-04
<i>Crabp2</i>	Cellular Retinoic Acid Binding Protein Ii	1.85	3.04e-04
<i>Tspan8</i>	Tetraspanin 8	1.84	3.03e-05
<i>Sspo</i>	Sco-Spondin	1.84	7.01e-05
<i>Ppl</i>	Periplakin	1.82	3.86e-04
<i>Myo1a</i>	Myosin Ia	1.82	4.11e-04
<i>Comp</i>	Cartilage Oligomeric Matrix Protein	1.82	2.32e-04
<i>Adgrg2</i>	Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2	1.81	3.03e-05
<i>Plcb3</i>	Phospholipase C, Beta 3	1.81	8.03e-05
<i>Thy1</i>	Thymus Cell Antigen 1, Theta	1.80	2.80e-10
<i>Tecta</i>	Tectorin Alpha	1.79	2.15e-03
<i>Gm26814</i>	Predicted Gene, 26814	1.79	1.30e-03
<i>Calcb</i>	Calcitonin-Related Polypeptide, Beta	1.79	8.03e-05
<i>Hspb1</i>	Heat Shock Protein 1	1.78	2.76e-04
<i>Till3</i>	Tubulin Tyrosine Ligase-Like Family, Member 3	1.78	1.02e-04
<i>Gm765</i>	Predicted Gene 765	1.78	2.39e-03
<i>Prrx2</i>	Paired Related Homeobox 2	1.78	2.02e-04
<i>Ucn2</i>	Urocortin 2	1.77	1.29e-03
<i>Gabbr2</i>	Gamma-Aminobutyric Acid (Gaba) C Receptor, Subunit Rho 2	1.77	2.35e-03
<i>F2rl2</i>	Coagulation Factor Ii (Thrombin) Receptor-Like 2	1.76	2.05e-05
<i>Stac</i>	Src Homology Three (Sh3) And Cysteine Rich Domain	1.75	2.38e-08
<i>Arhgap28</i>	Rho Gtpase Activating Protein 28	1.75	2.52e-03
<i>Aire</i>	Autoimmune Regulator (Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy)	1.75	3.16e-03
<i>1520401A03Rik</i>	Riken Cdna 1520401A03 Gene	1.74	3.84e-03
<i>RP24-79A6.8</i>		1.74	1.10e-03
<i>RP23-169H9.3</i>		1.74	1.49e-04
<i>Stbd1</i>	Starch Binding Domain 1	1.74	3.04e-03
<i>Uts2</i>	Urotensin 2	1.74	2.37e-03
<i>Ap1g2</i>	Adaptor Protein Complex Ap-1, Gamma 2 Subunit	1.74	1.35e-04
<i>1700124L16Rik</i>	Riken Cdna 1700124L16 Gene	1.74	2.91e-04
<i>RP23-394G5.2</i>		1.74	4.17e-03
<i>Cartpt</i>	Cart Prepropeptide	1.74	8.94e-04
<i>Plekhg4</i>	Pleckstrin Homology Domain Containing, Family G (With Rhogef Domain) Member 4	1.73	2.99e-05
<i>Muc2</i>	Mucin 2	1.73	1.30e-03
<i>Cckar</i>	Cholecystokinin A Receptor	1.73	8.93e-04

<i>BC051142</i>	Cdna Sequence Bc051142	1.73	2.93e-06
<i>Th</i>	Tyrosine Hydroxylase	1.73	3.06e-04
<i>Runx1</i>	Runt Related Transcription Factor 1	1.73	3.86e-03
<i>Htr3b</i>	5-Hydroxytryptamine (Serotonin) Receptor 3B	1.72	3.77e-03
<i>H2-M6-ps</i>	Histocompatibility 2, M Region Locus 6, Pseudogene	1.72	3.80e-03
<i>Ctrl</i>	Chymotrypsin-Like	1.72	1.73e-04
<i>Kcnip2</i>	Kv Channel-Interacting Protein 2	1.72	2.88e-09
<i>Slc22a18</i>	Solute Carrier Family 22 (Organic Cation Transporter), Member 18	1.72	3.10e-03
<i>Osbpl3</i>	Oxysterol Binding Protein-Like 3	1.71	4.29e-04
<i>1700011I03Rik</i>	Riken Cdna 1700011I03 Gene	1.71	5.04e-03
<i>Hhipl2</i>	Hedgehog Interacting Protein-Like 2	1.71	3.53e-05
<i>Gpr179</i>	G Protein-Coupled Receptor 179	1.71	2.90e-04
<i>C77080</i>	Expressed Sequence C77080	1.71	1.88e-04
<i>Bves</i>	Blood Vessel Epicardial Substance	1.71	3.42e-03
<i>Rspo4</i>	R-Spondin Family, Member 4	1.70	4.91e-03
<i>mmu-mir-409</i>	Mmu-Mir-409	1.70	5.70e-03
<i>Gm16334</i>	Predicted Gene 16334	1.70	6.15e-03
<i>A730011C13Rik</i>	Riken Cdna A730011C13 Gene	1.70	3.13e-07
<i>Zmynd10</i>	Zinc Finger, Mynd Domain Containing 10	1.70	1.20e-04
<i>RP24-232H5.2</i>		1.69	6.32e-03
<i>Dnase1l2</i>	Deoxyribonuclease 1-Like 2	1.69	1.50e-04
<i>Sall4</i>	Sal-Like 4 (Drosophila)	1.68	6.83e-03
<i>Chrn3</i>	Cholinergic Receptor, Nicotinic, Beta Polypeptide 3	1.68	1.41e-03
<i>Gnb3</i>	Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Beta 3	1.67	2.69e-03
<i>Prkcd</i>	Protein Kinase C, Delta	1.67	1.43e-06
<i>Rprm</i>	Reprimo, Tp53 Dependent G2 Arrest Mediator Candidate	1.67	7.59e-04
<i>Catip</i>	Ciliogenesis Associated Ttc17 Interacting Protein	1.67	4.22e-05
<i>Gm6030</i>	Predicted Gene 6030	1.67	3.62e-04
<i>Gli1</i>	Gli-Kruppel Family Member Gli1	1.66	1.52e-03
<i>Odf4</i>	Outer Dense Fiber Of Sperm Tails 4	1.66	2.35e-03
<i>4931429I11Rik</i>	Riken Cdna 4931429I11 Gene	1.66	1.02e-03
<i>Col6a1</i>	Collagen, Type Vi, Alpha 1	1.66	1.28e-04
<i>Il31ra</i>	Interleukin 31 Receptor A	1.66	4.36e-03
<i>Gm29374</i>	Predicted Gene 29374	1.66	1.76e-03
<i>Retn</i>	Resistin	1.66	8.07e-03
<i>Zfp57</i>	Zinc Finger Protein 57	1.65	3.14e-10
<i>Atoh8</i>	Atonal Homolog 8 (Drosophila)	1.65	9.94e-04
<i>Fmo4</i>	Flavin Containing Monooxygenase 4	1.65	7.08e-03
<i>Aldob</i>	Aldolase B, Fructose-Bisphosphate	1.64	1.30e-03

<i>B3gnt8</i>	Udp-Glcnac:Betagal Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase 8	1.64	1.14e-02
<i>Crb2</i>	Crumbs Family Member 2	1.64	2.46e-04
<i>Kcnh4</i>	Potassium Voltage-Gated Channel, Subfamily H (Eag-Related), Member 4	1.64	2.04e-03
<i>1810020O05Rik</i>	Riken Cdna 1810020O05 Gene	1.64	1.35e-03
<i>4933408B17Rik</i>	Riken Cdna 4933408B17 Gene	1.64	8.59e-05
<i>Rasgrp1</i>	Ras Guanyl Releasing Protein 1	1.63	4.94e-03
<i>Hcar2</i>	Hydroxycarboxylic Acid Receptor 2	1.63	1.03e-02
<i>Kcns1</i>	K+ Voltage-Gated Channel, Subfamily S, 1	1.63	3.90e-04
<i>Prdm6</i>	Pr Domain Containing 6	1.63	1.26e-02
<i>Akr1cl</i>	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member C-Like	1.63	1.20e-02
<i>Slc47a1</i>	Solute Carrier Family 47, Member 1	1.63	3.06e-03
<i>Runx3</i>	Runt Related Transcription Factor 3	1.63	1.13e-02
<i>Npc1ll1</i>	Npc1-Like 1	1.63	1.76e-03
<i>Klrg2</i>	Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily G, Member 2	1.63	3.36e-03
<i>Chrm1</i>	Cholinergic Receptor, Muscarinic 1, Cns	1.62	5.82e-04
<i>Sstr5</i>	Somatostatin Receptor 5	1.62	9.62e-03
<i>Cacnb3</i>	Calcium Channel, Voltage-Dependent, Beta 3 Subunit	1.62	2.70e-04
<i>Mapk15</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 15	1.62	7.91e-03
<i>AA914427</i>	Est Aa914427	1.62	1.62e-03
<i>RP23-297M4.4</i>		1.62	3.30e-03
<i>Ppp1r1a</i>	Protein Phosphatase 1, Regulatory (Inhibitor) Subunit 1A	1.62	8.71e-04
<i>Gm10714</i>	Predicted Gene 10714	1.62	5.13e-03
<i>Ssc5d</i>	Scavenger Receptor Cysteine Rich Family, 5 Domains	1.62	2.18e-04
<i>Insrr</i>	Insulin Receptor-Related Receptor	1.62	7.97e-03
<i>Gm11419</i>	Predicted Gene 11419	1.62	8.22e-03
<i>Tnni3</i>	Troponin I, Cardiac 3	1.61	2.82e-03
<i>Crhr2</i>	Corticotropin Releasing Hormone Receptor 2	1.61	4.57e-04
<i>Gm16102</i>	Predicted Gene 16102	1.61	1.50e-02
<i>Slc4a11</i>	Solute Carrier Family 4, Sodium Bicarbonate Transporter-Like, Member 11	1.61	3.52e-03
<i>Gm38157</i>	Predicted Gene, 38157	1.61	1.08e-02
<i>Rab3d</i>	Rab3D, Member Ras Oncogene Family	1.61	3.83e-03
<i>Gm10030</i>	Predicted Gene 10030	1.61	1.47e-03
<i>W11-2080J1.2</i>		1.61	1.38e-02
<i>Dnase1l3</i>	Deoxyribonuclease 1-Like 3	1.61	1.24e-02
<i>Ucn</i>	Urocortin	1.61	1.01e-02
<i>Gm27184</i>	Predicted Gene 27184	1.61	4.91e-03
<i>Lamc2</i>	Laminin, Gamma 2	1.61	8.31e-03
<i>Chia1</i>	Chitinase, Acidic 1	1.61	3.93e-03

<i>Crym</i>	Crystallin, Mu	1.60	1.64e-02
<i>Slc47a2</i>	Solute Carrier Family 47, Member 2	1.60	1.40e-02
<i>Clec18a</i>	C-Type Lectin Domain Family 18, Member A	1.60	1.70e-02
<i>Pou4f1</i>	Pou Domain, Class 4, Transcription Factor 1	1.60	2.13e-03
<i>BC089491</i>	Cdna Sequence Bc089491	1.60	1.48e-02
<i>4930526L06Rik</i>	Riken Cdna 4930526L06 Gene	1.60	5.86e-03
<i>Npr1</i>	Natriuretic Peptide Receptor 1	1.60	5.18e-05
<i>Dmkn</i>	Dermokine	1.60	1.73e-04
<i>Sncg</i>	Synuclein, Gamma	1.60	6.37e-03
<i>Cpne7</i>	Copine Vii	1.60	9.43e-04
<i>Thpo</i>	Thrombopoietin	1.60	1.41e-03
<i>Gm37999</i>	Predicted Gene, 37999	1.60	1.04e-02
<i>Misp</i>	Mitotic Spindle Positioning	1.59	1.54e-02
<i>Got1l1</i>	Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 1-Like 1	1.59	1.38e-02
<i>Slc5a4b</i>	Solute Carrier Family 5 (Neutral Amino Acid Transporters, System A), Member 4B	1.59	1.77e-02
<i>Tmc4</i>	Transmembrane Channel-Like Gene Family 4	1.59	2.25e-05
<i>Dgkz</i>	Diacylglycerol Kinase Zeta	1.59	2.18e-03
<i>Agtr1a</i>	Angiotensin Ii Receptor, Type 1A	1.59	6.85e-03
<i>Gm13301</i>	Predicted Gene 13301	1.59	1.18e-02
<i>Gcnt2</i>	Glucosaminyl (N-Acetyl) Transferase 2, I-Branching Enzyme	1.58	8.83e-03
<i>Socs1</i>	Suppressor Of Cytokine Signaling 1	1.58	1.90e-02
<i>Myh8</i>	Myosin, Heavy Polypeptide 8, Skeletal Muscle, Perinatal	1.58	1.79e-02
<i>RP24-260H22.2</i>		1.58	2.07e-02
<i>Gm16364</i>	Predicted Gene 16364	1.58	2.03e-02
<i>Kcnmb1</i>	Potassium Large Conductance Calcium-Activated Channel, Subfamily M, Beta Member 1	1.58	6.65e-03
<i>Omp</i>	Olfactory Marker Protein	1.58	1.26e-02
<i>Sctr</i>	Secretin Receptor	1.58	6.90e-03
<i>Eif4ebp1</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1	1.58	4.21e-03
<i>Ptgds</i>	Prostaglandin D2 Synthase (Brain)	1.58	1.47e-02
<i>Anxa2</i>	Annexin A2	1.58	1.04e-03
<i>Hcn3</i>	Hyperpolarization-Activated, Cyclic Nucleotide-Gated K+ 3	1.58	2.89e-03
<i>Cnga2</i>	Cyclic Nucleotide Gated Channel Alpha 2	1.58	1.84e-02
<i>AU022754</i>	Expressed Sequence Au022754	1.57	1.17e-03
<i>Gm17116</i>	Predicted Gene 17116	1.57	8.77e-03
<i>Prokr1</i>	Prokineticin Receptor 1	1.57	2.18e-02
<i>RP23-86H7.3</i>		1.57	1.10e-02
<i>Acrbp</i>	Proacrosin Binding Protein	1.57	1.35e-04
<i>Cfap126</i>	Cilia And Flagella Associated Protein 126	1.57	1.01e-03

<i>RP24-187P11.4</i>		1.57	1.20e-02
<i>1700016P03Rik</i>	Riken Cdna 1700016P03 Gene	1.57	1.71e-02
<i>Gm37490</i>	Predicted Gene, 37490	1.56	9.65e-03
<i>Als2cl</i>	Als2 C-Terminal Like	1.56	9.15e-05
<i>1700024P16Rik</i>	Riken Cdna 1700024P16 Gene	1.56	2.12e-02
<i>Gm13425</i>	Predicted Gene 13425	1.56	1.08e-07
<i>Ly86</i>	Lymphocyte Antigen 86	1.56	1.43e-02
<i>1700003M02Rik</i>	Riken Cdna 1700003M02 Gene	1.56	5.48e-04
<i>Batf3</i>	Basic Leucine Zipper Transcription Factor, Atf-Like 3	1.56	1.83e-02
<i>Bco1</i>	Beta-Carotene Oxygenase 1	1.56	1.51e-02
<i>A830036E02Rik</i>	Riken Cdna A830036E02 Gene	1.56	2.13e-02
<i>Grhl3</i>	Grainyhead-Like 3 (Drosophila)	1.56	1.79e-02
<i>0610009E02Rik</i>	Riken Cdna 0610009E02 Gene	1.56	2.42e-03
<i>Pxdn</i>	Peroxidasin Homolog (Drosophila)	1.56	3.42e-08
<i>Flt3l</i>	Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand	1.56	3.81e-04
<i>Tbx6</i>	T-Box 6	1.56	1.03e-02
<i>Atg16l2</i>	Autophagy Related 16-Like 2 (S. Cerevisiae)	1.56	2.67e-05
<i>Nek5</i>	Nima (Never In Mitosis Gene A)-Related Expressed Kinase 5	1.55	5.03e-03
<i>Gm15708</i>	Predicted Gene 15708	1.55	7.02e-03
<i>Gm37967</i>	Predicted Gene, 37967	1.55	2.68e-02
<i>Gm26736</i>	Predicted Gene, 26736	1.55	2.43e-02
<i>Tekt1</i>	Tektin 1	1.55	6.25e-04
<i>Slc2a4</i>	Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 4	1.55	1.02e-03
<i>Mug1</i>	Murinoglobulin 1	1.55	2.71e-02
<i>Trim72</i>	Tripartite Motif-Containing 72	1.55	1.64e-02
<i>Ihh</i>	Indian Hedgehog	1.55	1.91e-02
<i>Gm15675</i>	Predicted Gene 15675	1.55	5.22e-04
<i>Tbc1d10c</i>	Tbc1 Domain Family, Member 10C	1.55	1.20e-02
<i>Map3k15</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 15	1.55	3.85e-06
<i>Lrrc71</i>	Leucine Rich Repeat Containing 71	1.55	1.26e-03
<i>Tdrd9</i>	Tudor Domain Containing 9	1.54	2.90e-02
<i>Pdlim4</i>	Pdz And Lim Domain 4	1.54	9.65e-03
<i>Stx2</i>	Syntaxin 2	1.54	3.23e-09
<i>2900022M07Rik</i>	Riken Cdna 2900022M07 Gene	1.54	1.66e-02
<i>Lgals4</i>	Lectin, Galactose Binding, Soluble 4	1.54	1.96e-05
<i>Hmcn2</i>	Hemicentin 2	1.54	2.48e-02
<i>Prox2os</i>	Prospero Homeobox 2 Opposite Strand	1.54	1.96e-05
<i>E530001F21Rik</i>	Riken Cdna E530001F21 Gene	1.54	1.73e-02
<i>Ccdc22</i>	Coiled-Coil Domain Containing 22	1.54	3.98e-03
<i>Asprv1</i>	Aspartic Peptidase, Retroviral-Like 1	1.54	2.97e-02

<i>4931423N10Rik</i>	Riken Cdna 4931423N10 Gene	1.54	2.44e-02
<i>9430097D07Rik</i>	Riken Cdna 9430097D07 Gene	1.54	1.10e-02
<i>Dgkh</i>	Diacylglycerol Kinase, Eta	1.54	2.29e-02
<i>Ager</i>	Advanced Glycosylation End Product-Specific Receptor	1.54	2.65e-02
<i>RP24-360B3.2</i>		1.54	3.11e-02
<i>S100a10</i>	S100 Calcium Binding Protein A10 (Calpactin)	1.54	1.37e-03
<i>Gm7061</i>	Predicted Gene 7061	1.54	1.56e-02
<i>Lpar5</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 5	1.53	2.96e-02
<i>Kcnv1</i>	Potassium Channel, Subfamily V, Member 1	1.53	1.92e-02
<i>Hspb8</i>	Heat Shock Protein 8	1.53	1.91e-07
<i>Aloxe3</i>	Arachidonate Lipoxygenase 3	1.53	2.07e-03
<i>Cd44</i>	Cd44 Antigen	1.53	6.41e-03
<i>Slc6a19</i>	Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter), Member 19	1.53	1.73e-02
<i>Amy1</i>	Amylase 1, Salivary	1.53	2.66e-05
<i>Gm37706</i>	Predicted Gene, 37706	1.53	3.19e-02
<i>Podn</i>	Podocan	1.53	7.17e-03
<i>Agt</i>	Angiotensinogen (Serpin Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 8)	1.53	1.10e-02
<i>Galnt5</i>	Udp-N-Acetyl-Alpha-D-Galactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 5	1.53	3.09e-02
<i>Sned1</i>	Sushi, Nidogen And Egf-Like Domains 1	1.53	8.03e-05
<i>Cldn2</i>	Claudin 2	1.53	3.22e-02
<i>Endou</i>	Endonuclease, Polyu-Specific	1.53	8.24e-04
<i>Dusp5</i>	Dual Specificity Phosphatase 5	1.53	1.05e-03
<i>Rarres1</i>	Retinoic Acid Receptor Responder (Tazarotene Induced) 1	1.53	2.18e-04
<i>Bcam</i>	Basal Cell Adhesion Molecule	1.52	2.77e-02
<i>Kcnj4</i>	Potassium Inwardly-Rectifying Channel, Subfamily J, Member 4	1.52	3.62e-02
<i>Gm13199</i>	Predicted Gene 13199	1.52	7.17e-03
<i>Apela</i>	Apelin Receptor Early Endogenous Ligand	1.52	1.60e-02
<i>Parvaos</i>	Parvin, Alpha, Opposite Strand	1.52	2.96e-02
<i>Ngb</i>	Neuroglobin	1.52	3.95e-05
<i>Gm17641</i>	Predicted Gene, 17641	1.52	3.09e-02
<i>Thbs3</i>	Thrombospondin 3	1.52	7.46e-04
<i>Tm6sf2</i>	Transmembrane 6 Superfamily Member 2	1.52	1.09e-02
<i>Atf3</i>	Activating Transcription Factor 3	1.52	8.26e-03
<i>RP24-105K16.2</i>		1.52	3.28e-02
<i>Bcl3</i>	B Cell Leukemia/Lymphoma 3	1.52	3.19e-02
<i>Gm4980</i>	Predicted Gene 4980	1.52	2.92e-03
<i>Slc6a12</i>	Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter, Betaine/Gaba), Member 12	1.52	1.60e-02



<i>Cilp2</i>	Cartilage Intermediate Layer Protein 2	1.52	3.83e-02
<i>Tac1</i>	Tachykinin 1	1.52	4.43e-06
<i>Rtn4r1l</i>	Reticulon 4 Receptor-Like 1	1.52	3.39e-04
<i>Osr1</i>	Odd-Skipped Related 1 (Drosophila)	1.51	3.90e-02
<i>1600020E01Rik</i>	Riken Cdna 1600020E01 Gene	1.51	1.80e-06
<i>Stk36</i>	Serine/Threonine Kinase 36	1.51	4.76e-05
<i>Upk1a</i>	Uroplakin 1A	1.51	1.45e-02
<i>Saa2</i>	Serum Amyloid A 2	1.51	3.83e-02
<i>9430025C20Rik</i>	Riken Cdna 9430025C20 Gene	1.51	2.64e-02
<i>Ccl17</i>	Chemokine (C-C Motif) Ligand 17	1.51	3.91e-02
<i>Proser3</i>	Proline And Serine Rich 3	1.51	7.57e-04
<i>Rtbdn</i>	Retbindin	1.51	2.18e-02
<i>Nnat</i>	Neuronatin	1.51	2.76e-02
<i>Gm27239</i>	Predicted Gene 27239	1.51	2.51e-02
<i>Vax2os</i>	Ventral Anterior Homeobox 2, Opposite Strand	1.51	2.59e-02
<i>Lsp1</i>	Lymphocyte Specific 1	1.51	1.06e-03
<i>Magel2</i>	Melanoma Antigen, Family L, 2	1.51	1.08e-03
<i>D130019J16Rik</i>	Riken Cdna D130019J16 Gene	1.51	2.65e-02
<i>Myo1h</i>	Myosin 1H	1.50	8.29e-03
<i>Clic1</i>	Chloride Intracellular Channel 1	1.50	1.38e-04
<i>Gm8738</i>	Predicted Gene 8738	1.50	4.38e-02
<i>RP23-301C7.2</i>		1.50	2.42e-02
<i>Fam71d</i>	Family With Sequence Similarity 71, Member D	1.50	3.35e-02
<i>Kcnj13</i>	Potassium Inwardly-Rectifying Channel, Subfamily J, Member 13	1.50	3.60e-02
<i>Xlr4c</i>	X-Linked Lymphocyte-Regulated 4C	1.50	4.32e-02
<i>W11-535J9.1</i>		1.50	1.38e-02
<i>Arsi</i>	Arylsulfatase I	1.50	4.40e-02
<i>Utp14b</i>	Utp14, U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein, Homolog B (Yeast)	0.67	5.70e-03
<i>Mobp</i>	Myelin-Associated Oligodendrocytic Basic Protein	0.67	6.72e-06
<i>Cdh12</i>	Cadherin 12	0.67	1.47e-02
<i>Itgb3</i>	Integrin Beta 3	0.67	3.10e-04
<i>Dok6</i>	Docking Protein 6	0.67	2.92e-02
<i>Klrb1a</i>	Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily B Member 1A	0.67	2.59e-02
<i>Znf41-ps</i>	Znf41, Pseudogene	0.67	4.11e-02
<i>8030453O22Rik</i>	Riken Cdna 8030453O22 Gene	0.67	3.77e-02
<i>Fam101b</i>	Family With Sequence Similarity 101, Member B	0.67	4.24e-05
<i>Pcdhb11</i>	Protocadherin Beta 11	0.67	4.37e-03
<i>Trim37</i>	Tripartite Motif-Containing 37	0.67	9.74e-06
<i>Gm26397</i>	Predicted Gene, 26397	0.67	3.76e-02

<i>Gpc5</i>	Glypican 5	0.67	2.48e-03
<i>Kmo</i>	Kynurenine 3-Monooxygenase (Kynurenine 3-Hydroxylase)	0.67	3.80e-02
<i>Adgrl4</i>	Adhesion G Protein-Coupled Receptor L4	0.67	1.51e-03
<i>Zfp871</i>	Zinc Finger Protein 871	0.67	1.67e-02
<i>Gm15631</i>	Predicted Gene 15631	0.67	8.54e-04
<i>Lpar6</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 6	0.67	1.59e-04
<i>Gm21984</i>	Predicted Gene 21984	0.66	2.04e-02
<i>Pcdhga10</i>	Protocadherin Gamma Subfamily A, 10	0.66	1.39e-02
<i>Fam198b</i>	Family With Sequence Similarity 198, Member B	0.66	5.01e-03
<i>Gm13387</i>	Predicted Gene 13387	0.66	2.44e-02
<i>Etl4</i>	Enhancer Trap Locus 4	0.66	3.96e-07
<i>Gas2l3</i>	Growth Arrest-Specific 2 Like 3	0.66	2.41e-02
<i>Gm12663</i>	Predicted Gene 12663	0.66	7.02e-03
<i>Pcdhgb2</i>	Protocadherin Gamma Subfamily B, 2	0.66	1.52e-02
<i>Itga2</i>	Integrin Alpha 2	0.66	3.94e-02
<i>Gm37268</i>	Predicted Gene, 37268	0.66	3.88e-02
<i>Gm17382</i>	Predicted Gene, 17382	0.66	1.26e-03
<i>Nek2</i>	Nima (Never In Mitosis Gene A)-Related Expressed Kinase 2	0.66	1.47e-02
<i>Gm17732</i>	Predicted Gene, 17732	0.66	4.52e-03
<i>Gm20632</i>	Predicted Gene 20632	0.66	2.39e-02
<i>Adgrf5</i>	Adhesion G Protein-Coupled Receptor F5	0.66	2.38e-06
<i>Epha6</i>	Eph Receptor A6	0.66	1.78e-02
<i>Rab7b</i>	Rab7B, Member Ras Oncogene Family	0.66	3.05e-04
<i>Uhmk1</i>	U2Af Homology Motif (Uhm) Kinase 1	0.66	6.54e-04
<i>Gm13091</i>	Predicted Gene 13091	0.66	1.71e-02
<i>Slc16a14</i>	Solute Carrier Family 16 (Monocarboxylic Acid Transporters), Member 14	0.66	2.02e-03
<i>Ston2</i>	Stonin 2	0.66	9.07e-03
<i>Pcdhga7</i>	Protocadherin Gamma Subfamily A, 7	0.66	1.41e-02
<i>Unc5b</i>	Unc-5 Homolog B (C. Elegans)	0.66	3.38e-04
<i>Ankrd34b</i>	Ankyrin Repeat Domain 34B	0.66	4.33e-05
<i>Mob3b</i>	Mob Kinase Activator 3B	0.66	4.07e-04
<i>Gm37242</i>	Predicted Gene, 37242	0.66	1.02e-02
<i>Fam217a</i>	Family With Sequence Similarity 217, Member A	0.66	3.53e-02
<i>Elovl2</i>	Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids (Fen1/Elo2, Sur4/Elo3, Yeast)-Like 2	0.66	5.05e-06
<i>Dmpl</i>	Dentin Matrix Protein 1	0.66	7.21e-04
<i>Sptssb</i>	Serine Palmitoyltransferase, Small Subunit B	0.66	2.41e-05
<i>Gm13832</i>	Predicted Gene 13832	0.66	2.42e-02
<i>M5C1000I18Rik</i>	Riken Cdna M5C1000I18 Gene	0.65	1.34e-02
<i>Megf11</i>	Multiple Egf-Like-Domains 11	0.65	2.02e-15



<i>Gm15319</i>	Predicted Gene 15319	0.65	3.33e-02
<i>Alx4</i>	Aristaless-Like Homeobox 4	0.65	1.26e-02
<i>Arhgap5</i>	Rho Gtpase Activating Protein 5	0.65	1.85e-02
<i>Lnpep</i>	Leucyl/Cystinyl Aminopeptidase	0.65	2.76e-02
<i>Hs6st3</i>	Heparan Sulfate 6-O-Sulfotransferase 3	0.65	2.01e-02
<i>4930455G09Rik</i>	Riken Cdna 4930455G09 Gene	0.65	1.57e-02
<i>D130040H23Rik</i>	Riken Cdna D130040H23 Gene	0.65	2.05e-02
<i>Slc30a1</i>	Solute Carrier Family 30 (Zinc Transporter), Member 1	0.65	2.24e-04
<i>Map2k6</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6	0.65	1.02e-04
<i>Nexn</i>	Nexilin	0.65	7.64e-06
<i>Tcf23</i>	Transcription Factor 23	0.65	1.24e-02
<i>Ccnjl</i>	Cyclin J-Like	0.65	8.45e-04
<i>Prkag3</i>	Protein Kinase, Amp-Activated, Gamma 3 Non-Catalytic Subunit	0.65	1.47e-02
<i>9530080O11Rik</i>	Riken Cdna 9530080O11 Gene	0.65	6.25e-03
<i>Cxcl12</i>	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12	0.65	1.62e-03
<i>Gm15880</i>	Predicted Gene 15880	0.65	3.02e-02
<i>Slc25a34</i>	Solute Carrier Family 25, Member 34	0.65	9.42e-03
<i>Nkain3</i>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> Transporting Atpase Interacting 3	0.65	1.57e-02
<i>Pcdhga8</i>	Protocadherin Gamma Subfamily A, 8	0.65	1.26e-02
<i>Dmrta1</i>	Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor Like Family A1	0.65	2.86e-02
<i>Abcc9</i>	Atp-Binding Cassette, Sub-Family C (Cfr/Mrp), Member 9	0.65	1.20e-03
<i>A930006I01Rik</i>	Riken Cdna A930006I01 Gene	0.65	2.96e-02
<i>Gm9938</i>	Predicted Gene 9938	0.65	2.25e-02
<i>Atp8a2</i>	Atpase, Aminophospholipid Transporter-Like, Class I, Type 8A, Member 2	0.65	5.04e-03
<i>Gm37776</i>	Predicted Gene, 37776	0.65	7.97e-03
<i>Gm26519</i>	Predicted Gene, 26519	0.65	2.77e-02
<i>Gm12198</i>	Predicted Gene 12198	0.65	2.21e-02
<i>Spink10</i>	Serine Peptidase Inhibitor, Kazal Type 10	0.65	4.00e-03
<i>Pon3</i>	Paraoxonase 3	0.65	2.66e-03
<i>Abcd2</i>	Atp-Binding Cassette, Sub-Family D (Ald), Member 2	0.65	6.97e-05
<i>Kcng4</i>	Potassium Voltage-Gated Channel, Subfamily G, Member 4	0.65	1.96e-05
<i>2310069G16Rik</i>	Riken Cdna 2310069G16 Gene	0.65	2.49e-04
<i>Hist1h2be</i>	Histone Cluster 1, H2Be	0.65	4.06e-03
<i>Gm13293</i>	Predicted Gene 13293	0.65	3.46e-04
<i>Ankfn1</i>	Ankyrin-Repeat And Fibronectin Type Iii Domain Containing 1	0.65	2.13e-02
<i>mt-Nd2</i>	Mitochondrially Encoded Nadh Dehydrogenase 2	0.65	3.15e-04
<i>Lctl</i>	Lactase-Like	0.64	2.91e-03

<i>A330069K06Rik</i>	Riken Cdna A330069K06 Gene	0.64	2.49e-02
<i>Slc6a4</i>	Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter, Serotonin), Member 4	0.64	2.03e-02
<i>Hcn2</i>	Hyperpolarization-Activated, Cyclic Nucleotide-Gated K <sup>+</sup> 2	0.64	1.72e-04
<i>Gm36944</i>	Predicted Gene, 36944	0.64	2.46e-02
<i>Gm26723</i>	Predicted Gene, 26723	0.64	2.35e-02
<i>Klhl4</i>	Kelch-Like 4	0.64	1.61e-03
<i>Fzd4</i>	Frizzled Homolog 4 (Drosophila)	0.64	6.19e-03
<i>Pcdh9</i>	Protocadherin 9	0.64	1.25e-03
<i>Robo1</i>	Roundabout Homolog 1 (Drosophila)	0.64	4.94e-06
<i>Nipal</i>	Non Imprinted In Prader-Willi/Angelman Syndrome 1 Homolog (Human)	0.64	1.17e-04
<i>Gm9581</i>	Predicted Gene 9581	0.64	1.21e-02
<i>Itga1</i>	Integrin Alpha 1	0.64	6.44e-03
<i>Cyp2j12</i>	Cytochrome P450, Family 2, Subfamily J, Polypeptide 12	0.64	2.76e-04
<i>RP23-267O21.3</i>		0.64	2.07e-02
<i>1700063D05Rik</i>	Riken Cdna 1700063D05 Gene	0.64	2.10e-02
<i>Bcas1</i>	Breast Carcinoma Amplified Sequence 1	0.64	7.34e-07
<i>Trp53inp2</i>	Transformation Related Protein 53 Inducible Nuclear Protein 2	0.64	3.23e-09
<i>Gm25835</i>	Predicted Gene, 25835	0.64	2.20e-02
<i>Kcna2</i>	Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-Related Subfamily, Member 2	0.64	5.62e-11
<i>Gm816</i>	Predicted Gene 816	0.64	2.20e-02
<i>Pcdhgb1</i>	Protocadherin Gamma Subfamily B, 1	0.63	1.08e-02
<i>Serpind1</i>	Serine (Or Cysteine) Peptidase Inhibitor, Clade D, Member 1	0.63	2.12e-03
<i>4930578C19Rik</i>	Riken Cdna 4930578C19 Gene	0.63	2.05e-03
<i>Pcdhb21</i>	Protocadherin Beta 21	0.63	2.09e-03
<i>Gm15697</i>	Predicted Gene 15697	0.63	1.26e-02
<i>1700008O03Rik</i>	Riken Cdna 1700008O03 Gene	0.63	1.23e-04
<i>Klhl11</i>	Kelch-Like 11	0.63	9.74e-03
<i>Eif5a2</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A2	0.63	3.88e-04
<i>4930500F10Rik</i>	Riken Cdna 4930500F10 Gene	0.63	1.32e-02
<i>Fcrls</i>	Fc Receptor-Like S, Scavenger Receptor	0.63	4.87e-03
<i>Tmem181c-ps</i>	Transmembrane Protein 181C, Pseudogene	0.63	1.59e-02
<i>RP23-63A19.1</i>		0.63	2.15e-03
<i>Ncam2</i>	Neural Cell Adhesion Molecule 2	0.63	6.34e-03
<i>Clec14a</i>	C-Type Lectin Domain Family 14, Member A	0.63	3.73e-04
<i>Slc9a7</i>	Solute Carrier Family 9 (Sodium/Hydrogen Exchanger), Member 7	0.63	8.23e-03
<i>Hipk2</i>	Homeodomain Interacting Protein Kinase 2	0.63	6.43e-03
<i>Apln</i>	Apelin	0.63	6.65e-10

<i>Gm22486</i>	Predicted Gene, 22486	0.63	1.02e-02
<i>Adamts12</i>	A Disintegrin-Like And Metallopeptidase (Reprolysin Type) With Thrombospondin Type 1 Motif, 12	0.63	7.32e-03
<i>Pcdha12</i>	Protocadherin Alpha 12	0.63	4.88e-03
<i>Zfp607</i>	Zinc Finger Protein 607	0.63	6.32e-03
<i>Gm28321</i>	Predicted Gene 28321	0.63	1.79e-02
<i>Gm25107</i>	Predicted Gene, 25107	0.63	1.72e-02
<i>Kif5b</i>	Kinesin Family Member 5B	0.63	1.17e-05
<i>Cd300e</i>	Cd300E Antigen	0.62	1.29e-02
<i>Olfr287</i>	Olfactory Receptor 287	0.62	4.55e-09
<i>Plscr5</i>	Phospholipid Scramblase Family, Member 5	0.62	1.26e-02
<i>Hist1h1e</i>	Histone Cluster 1, H1E	0.62	1.62e-02
<i>Gm28322</i>	Predicted Gene 28322	0.62	1.48e-02
<i>Gpd1</i>	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1 (Soluble)	0.62	7.14e-08
<i>Ugt8a</i>	Udp Galactosyltransferase 8A	0.62	1.06e-03
<i>Oprm1</i>	Opioid Receptor, Mu 1	0.62	1.20e-02
<i>Uprt</i>	Uracil Phosphoribosyltransferase (Fur1) Homolog (S. Cerevisiae)	0.62	6.23e-03
<i>Pcdha7</i>	Protocadherin Alpha 7	0.62	1.11e-02
<i>Klk6</i>	Kallikrein Related-Peptidase 6	0.62	6.46e-04
<i>Il33</i>	Interleukin 33	0.62	9.11e-05
<i>Gabrb2</i>	Gamma-Aminobutyric Acid (Gaba) A Receptor, Subunit Beta 2	0.61	7.74e-03
<i>Vamp7-ps</i>	Vesicle-Associated Membrane Protein 7, Pseudogene	0.61	1.18e-03
<i>Pmp2</i>	Peripheral Myelin Protein 2	0.61	1.23e-02
<i>Gm20628</i>	Predicted Gene 20628	0.61	2.52e-03
<i>Gm16576</i>	Predicted Gene 16576	0.61	7.79e-04
<i>Esrrg</i>	Estrogen-Related Receptor Gamma	0.61	1.97e-04
<i>1700082M22Rik</i>	Riken Cdna 1700082M22 Gene	0.61	1.10e-02
<i>Gucyl1a2</i>	Guanylate Cyclase 1, Soluble, Alpha 2	0.61	1.06e-02
<i>Nxpe4</i>	Neurexophilin And Pc-Esterase Domain Family, Member 4	0.61	3.67e-04
<i>D16Ert472e</i>	Dna Segment, Chr 16, Erato Doi 472, Expressed	0.61	4.83e-04
<i>1700020I14Rik</i>	Riken Cdna 1700020I14 Gene	0.61	4.91e-06
<i>Fgf3</i>	Fibroblast Growth Factor 3	0.61	2.18e-04
<i>Snord22</i>	Small Nucleolar Rna, C/D Box 22	0.61	8.28e-03
<i>Slc6a5</i>	Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter, Glycine), Member 5	0.61	5.54e-08
<i>Enpp3</i>	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3	0.61	2.07e-03
<i>Cox8b</i>	Cytochrome C Oxidase Subunit Viiiib	0.61	9.01e-03
<i>Yam1</i>	Yy1 Associated Myogenesis Rna 1	0.61	2.09e-03
<i>Gm13619</i>	Predicted Gene 13619	0.61	5.63e-03
<i>Kcna1</i>	Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-Related Subfamily, Member 1	0.61	1.47e-09

<i>A330074K22Rik</i>	Riken Cdna A330074K22 Gene	0.61	1.53e-03
<i>Apol10b</i>	Apolipoprotein L 10B	0.61	1.03e-02
<i>Gm37785</i>	Predicted Gene, 37785	0.61	7.02e-03
<i>Unc13c</i>	Unc-13 Homolog C (C. Elegans)	0.60	6.55e-05
<i>Lum</i>	Lumican	0.60	5.72e-03
<i>mt-T11</i>	Mitochondrially Encoded Trna Leucine 1	0.60	3.69e-03
<i>Atp10b</i>	Atpase, Class V, Type 10B	0.60	5.19e-06
<i>Gm37132</i>	Predicted Gene, 37132	0.60	4.37e-03
<i>Enpp6</i>	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 6	0.60	1.01e-04
<i>4930432E11Rik</i>	Riken Cdna 4930432E11 Gene	0.60	4.74e-03
<i>Rmrp</i>	Rna Component Of Mitochondrial Rnaase P	0.60	1.58e-06
<i>Klrblc</i>	Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily B Member 1C	0.60	7.63e-03
<i>Depdc1b</i>	Dep Domain Containing 1B	0.60	1.39e-03
<i>Pm20d1</i>	Peptidase M20 Domain Containing 1	0.60	9.49e-06
<i>Gm14412</i>	Predicted Gene 14412	0.60	1.10e-03
<i>Gm833</i>	Predicted Gene 833	0.59	6.42e-03
<i>Mcf2</i>	Mcf.2 Transforming Sequence	0.59	1.91e-09
<i>Btc</i>	Betacellulin, Epidermal Growth Factor Family Member	0.59	2.43e-03
<i>Tmprss5</i>	Transmembrane Protease, Serine 5 (Spinesin)	0.59	3.54e-05
<i>W11-1749A12.1</i>		0.59	3.93e-03
<i>Spp1</i>	Secreted Phosphoprotein 1	0.59	3.11e-05
<i>Dusp19</i>	Dual Specificity Phosphatase 19	0.59	8.03e-05
<i>Rgs5</i>	Regulator Of G-Protein Signaling 5	0.58	2.67e-09
<i>RP23-181C16.4</i>		0.58	3.40e-04
<i>Ptprb</i>	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, B	0.58	2.21e-08
<i>Slfn5</i>	Schlafen 5	0.58	8.68e-04
<i>Rn7sk</i>	Rna, 7Sk, Nuclear	0.58	2.90e-05
<i>Gm13558</i>	Predicted Gene 13558	0.58	2.40e-04
<i>Steap2</i>	Six Transmembrane Epithelial Antigen Of Prostate 2	0.58	2.05e-09
<i>Sc5d</i>	Sterol-C5-Desaturase (Fungal Erg3, Delta-5-Desaturase) Homolog (S. Cerevisiae)	0.58	5.54e-08
<i>4930506C21Rik</i>	Riken Cdna 4930506C21 Gene	0.58	2.36e-05
<i>Bub1b</i>	Budding Uninhibited By Benzimidazoles 1 Homolog, Beta (S. Cerevisiae)	0.58	3.48e-03
<i>5430416O09Rik</i>	Riken Cdna 5430416O09 Gene	0.57	9.34e-05
<i>Gm38255</i>	Predicted Gene, 38255	0.57	2.94e-03
<i>Strip2</i>	Striatin Interacting Protein 2	0.57	1.01e-08
<i>Chn1os1</i>	Chimerin 1, Opposite Strand 1	0.57	2.77e-03
<i>Dcc</i>	Deleted In Colorectal Carcinoma	0.57	7.94e-04
<i>Rpph1</i>	Ribonuclease P Rna Component H1	0.57	2.90e-06
<i>Gm33366</i>	Predicted Gene, 33366	0.57	8.22e-04

<i>Galnt16</i>	Udp-N-Acetyl-Alpha-D-Galactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase-Like 6	0.57	7.02e-04
<i>Acan</i>	Aggrecan	0.56	3.91e-13
<i>Gm36947</i>	Predicted Gene, 36947	0.56	2.18e-03
<i>Sucnr1</i>	Succinate Receptor 1	0.56	1.29e-03
<i>5031414D18Rik</i>	Riken Cdna 5031414D18 Gene	0.56	2.67e-09
<i>Glr1</i>	Glycine Receptor, Alpha 1 Subunit	0.56	8.24e-04
<i>Asah2</i>	N-Acylsphingosine Amidohydrolase 2	0.55	3.85e-06
<i>Lingo4</i>	Leucine Rich Repeat And Ig Domain Containing 4	0.55	4.39e-04
<i>Scn4b</i>	Sodium Channel, Type Iv, Beta	0.55	2.59e-17
<i>Kcnc3</i>	Potassium Voltage Gated Channel, Shaw-Related Subfamily, Member 3	0.54	4.08e-14
<i>Slc40a1</i>	Solute Carrier Family 40 (Iron-Regulated Transporter), Member 1	0.54	1.28e-08
<i>Gm26633</i>	Predicted Gene, 26633	0.54	3.40e-07
<i>Gm10010</i>	Predicted Gene 10010	0.54	3.26e-04
<i>Gm15564</i>	Predicted Gene 15564	0.53	6.19e-05
<i>Pcdhgb4</i>	Protocadherin Gamma Subfamily B, 4	0.53	1.71e-06
<i>Mir6240</i>	Microrna 6240	0.53	2.67e-06
<i>Gm15662</i>	Predicted Gene 15662	0.53	1.08e-05
<i>Gm24265</i>	Predicted Gene, 24265	0.52	1.05e-10
<i>Lars2</i>	Leucyl-Trna Synthetase, Mitochondrial	0.52	2.49e-05
<i>Mir6236</i>	Microrna 6236	0.52	9.11e-06
<i>Samd5</i>	Sterile Alpha Motif Domain Containing 5	0.52	1.54e-05
<i>Calcoco2</i>	Calcium Binding And Coiled-Coil Domain 2	0.52	4.18e-04
<i>Hapln1</i>	Hyaluronan And Proteoglycan Link Protein 1	0.52	3.13e-07
<i>Gm830</i>	Predicted Gene 830	0.51	2.85e-04
<i>Clca3a2</i>	Chloride Channel Calcium Activated 3A2	0.51	2.31e-04
<i>Gm25117</i>	Predicted Gene, 25117	0.51	1.57e-04
<i>Crygs</i>	Crystallin, Gamma S	0.50	1.58e-04
<i>Gm15512</i>	Predicted Gene 15512	0.50	2.10e-05
<i>Aqp6</i>	Aquaporin 6	0.50	5.09e-06
<i>Fbxo47</i>	F-Box Protein 47	0.50	8.49e-06
<i>Slc34a3</i>	Solute Carrier Family 34 (Sodium Phosphate), Member 3	0.50	2.41e-05
<i>mt-Tm</i>	Mitochondrially Encoded Trna Methionine	0.49	2.44e-05
<i>Hsd11b1</i>	Hydroxysteroid 11-Beta Dehydrogenase 1	0.49	7.08e-13
<i>Atp2b1</i>	Atpase, Ca <sup>++</sup> Transporting, Plasma Membrane 1	0.49	4.28e-15
<i>Gm26673</i>	Predicted Gene, 26673	0.47	8.00e-18
<i>Gm24407</i>	Predicted Gene, 24407	0.47	3.31e-13
<i>Gm4524</i>	Predicted Gene 4524	0.45	2.67e-10
<i>Rny3</i>	Rna, Y3 Small Cytoplasmic (Associated With Ro Protein)	0.44	4.73e-14

<i>Fbxo40</i>	F-Box Protein 40	0.44	1.92e-11
<i>A730020M07Rik</i>	Riken Cdna A730020M07 Gene	0.41	2.67e-09
<i>Gm10684</i>	Predicted Gene 10684	0.38	1.70e-10
<i>Smyd1</i>	Set And Mynd Domain Containing 1	0.37	6.17e-12
<i>Rny1</i>	Rna, Y1 Small Cytoplasmic, Ro-Associated	0.37	2.59e-17
<i>Chrna2</i>	Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha Polypeptide 2 (Neuronal)	0.32	4.30e-21
<i>Mybpc3</i>	Myosin Binding Protein C, Cardiac	0.31	4.08e-14

**Supplementary table 3** : Genes with altered expression in CHMP2B<sup>intron5</sup> mice compared to non-transgenic littermates at symptomatic stage. Genes were selected as follow: adjusted *p*-value <0.05; FC<0.67 or >1.5.





<i>Gm37859</i>	Predicted gene, 37859	1.69	2.09e-03
<i>Fmo4</i>	Flavin containing monooxygenase 4	1.69	1.58e-03
<i>Cd68</i>	CD68 antigen	1.69	5.96e-07
<i>Gfap</i>	Glial fibrillary acidic protein	1.68	2.27e-12
<i>Chrm1</i>	Cholinergic receptor, muscarinic 1, CNS	1.68	1.56e-05
<i>Gli2</i>	GLI-Kruppel family member GLI2	1.68	6.28e-06
<i>Fgfr4</i>	Fibroblast growth factor receptor 4	1.67	1.18e-03
<i>Crb2</i>	Crumbs family member 2	1.67	1.01e-05
<i>Slc24a4</i>	Solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 4	1.66	1.61e-08
<i>Ccl3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 3	1.66	5.77e-03
<i>Prrx2</i>	Paired related homeobox 2	1.66	2.82e-04
<i>Pcsk4</i>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4	1.66	4.11e-03
<i>Ppl</i>	Periplakin	1.66	9.95e-04
<i>Ppp1r1a</i>	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	1.66	4.17e-05
<i>Atf3</i>	Activating transcription factor 3	1.66	1.49e-04
<i>Kcnk7</i>	Potassium channel, subfamily K, member 7	1.65	5.95e-03
<i>Catsper3</i>	Cation channel, sperm associated 3	1.65	1.28e-03
<i>Gm5914</i>	Predicted gene 5914	1.65	3.23e-03
<i>Ctxn3</i>	Cortexin 3	1.65	5.40e-04
<i>Col27a1</i>	Collagen, type XXVII, alpha 1	1.64	3.26e-05
<i>Agt</i>	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	1.64	4.98e-04
<i>5730596B20Rik</i>	RIKEN cDNA 5730596B20 gene	1.64	3.85e-03
<i>Pdlim4</i>	PDZ and LIM domain 4	1.64	6.29e-04
<i>Myo1h</i>	Myosin 1H	1.64	1.55e-04
<i>Igsf1</i>	Immunoglobulin superfamily, member 1	1.63	3.94e-05
<i>Psrc1</i>	Proline/serine-rich coiled-coil 1	1.62	2.54e-04
<i>Ap1g2</i>	Adaptor protein complex AP-1, gamma 2 subunit	1.62	1.75e-04
<i>Tmem52</i>	Transmembrane protein 52	1.62	8.45e-03
<i>Ovgp1</i>	Oviductal glycoprotein 1	1.62	2.89e-05
<i>Gm15708</i>	Predicted gene 15708	1.62	6.01e-04
<i>Als2cl</i>	ALS2 C-terminal like	1.61	6.64e-07
<i>Dpep1</i>	Dipeptidase 1 (renal)	1.61	1.02e-02
<i>Notum</i>	Notum pectinacetyltransferase homolog (Drosophila)	1.61	1.60e-03
<i>Sapcd1</i>	Suppressor APC domain containing 1	1.61	8.41e-03
<i>Aloxe3</i>	Arachidonate lipoxygenase 3	1.61	5.32e-05
<i>RP23-135F23.1</i>		1.6	9.86e-03
<i>Gli1</i>	GLI-Kruppel family member GLI1	1.6	8.43e-04
<i>Chaf1b</i>	Chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)	1.6	3.18e-03
<i>P2rx2</i>	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2	1.6	2.58e-03



<i>Tepp</i>	Testis, prostate and placenta expressed	1.6	5.38e-03
<i>Arl11</i>	ADP-ribosylation factor-like 11	1.6	1.04e-03
<i>Gm19412</i>	Predicted gene, 19412	1.6	7.21e-03
<i>Atoh8</i>	Atonal homolog 8 (Drosophila)	1.6	4.29e-04
<i>A730011C13Rik</i>	RIKEN cDNA A730011C13 gene	1.6	2.63e-07
<i>Catip</i>	Ciliogenesis associated TTC17 interacting protein	1.6	1.68e-05
<i>Mrgprf</i>	MAS-related GPR, member F	1.59	2.14e-03
<i>Tmem74bos</i>	Transmembrane 74B, opposite strand	1.59	4.44e-03
<i>Klc3</i>	Kinesin light chain 3	1.59	9.15e-03
<i>Lgals4</i>	Lectin, galactose binding, soluble 4	1.59	5.56e-08
<i>Echdc3</i>	Enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	1.59	2.52e-04
<i>Bmp1</i>	Bone morphogenetic protein 1	1.58	1.62e-05
<i>Cartpt</i>	CART prepropeptide	1.58	2.25e-03
<i>Map3k6</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	1.58	1.38e-02
<i>Hif3a</i>	Hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	1.58	1.39e-02
<i>Ccdc36</i>	Coiled-coil domain containing 36	1.58	1.37e-02
<i>Gm8738</i>	Predicted gene 8738	1.58	1.36e-02
<i>Ngb</i>	Neuroglobin	1.57	1.05e-07
<i>Vwce</i>	Von Willebrand factor C and EGF domains	1.57	5.25e-03
<i>Chrn4</i>	Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 4	1.57	9.04e-05
<i>Tll3</i>	Tubulin tyrosine ligase-like family, member 3	1.57	8.02e-04
<i>Adamts14</i>	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 14	1.57	3.48e-04
<i>Etnk2</i>	Ethanolamine kinase 2	1.57	2.40e-05
<i>Alpk3</i>	Alpha-kinase 3	1.57	1.22e-02
<i>RP24-79A6.8</i>		1.56	3.79e-03
<i>Calcb</i>	Calcitonin-related polypeptide, beta	1.56	7.88e-04
<i>Tnni3</i>	Troponin I, cardiac 3	1.56	1.55e-03
<i>Hspb1</i>	Heat shock protein 1	1.56	2.07e-03
<i>RP23-394G5.2</i>		1.56	1.56e-02
<i>Zap70</i>	Zeta-chain (TCR) associated protein kinase	1.56	7.35e-03
<i>Dchs1</i>	Dachsous 1 (Drosophila)	1.56	1.50e-05
<i>Adgrg5</i>	Adhesion G protein-coupled receptor G5	1.56	1.29e-02
<i>Kif17</i>	Kinesin family member 17	1.56	4.09e-04
<i>Sap30bpos</i>	SAP30 binding protein, opposite strand	1.56	3.48e-03
<i>Entpd2</i>	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	1.56	6.34e-04
<i>Ccdc57</i>	Coiled-coil domain containing 57	1.56	1.93e-05
<i>Tfr2</i>	Transferrin receptor 2	1.56	1.05e-03
<i>Efna4</i>	Ephrin A4	1.56	2.12e-03
<i>RP23-297M4.4</i>		1.56	2.55e-03
<i>Trim72</i>	Tripartite motif-containing 72	1.55	6.71e-03

<i>Ggt5</i>	Gamma-glutamyltransferase 5	1.55	4.28e-07
<i>Ssc5d</i>	Scavenger receptor cysteine rich family, 5 domains	1.55	9.04e-05
<i>Naprt</i>	Nicotinate phosphoribosyltransferase	1.55	6.94e-04
<i>Gm26736</i>	Predicted gene, 26736	1.55	1.35e-02
<i>Muc2</i>	Mucin 2	1.55	4.84e-03
<i>Mapk15</i>	Mitogen-activated protein kinase 15	1.55	7.35e-03
<i>Slc37a1</i>	Solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 1	1.55	9.04e-06
<i>Pnoc</i>	Prepronociceptin	1.55	1.30e-03
<i>Gm37999</i>	Predicted gene, 37999	1.54	7.21e-03
<i>Thpo</i>	Thrombopoietin	1.54	7.07e-04
<i>Spint2</i>	Serine protease inhibitor, Kunitz type 2	1.54	1.73e-05
<i>Scarf2</i>	Scavenger receptor class F, member 2	1.54	8.07e-03
<i>Tead3</i>	TEA domain family member 3	1.54	1.74e-03
<i>Hcn3</i>	Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K <sup>+</sup> 3	1.54	1.13e-03
<i>Wisp2</i>	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	1.54	2.08e-02
<i>AU022754</i>	Expressed sequence AU022754	1.54	4.84e-04
<i>Adck4</i>	AarF domain containing kinase 4	1.54	6.25e-04
<i>Crhr2</i>	Corticotropin releasing hormone receptor 2	1.54	3.00e-04
<i>Rreb1</i>	Ras responsive element binding protein 1	1.54	4.95e-08
<i>Col6a1</i>	Collagen, type VI, alpha 1	1.54	2.20e-04
<i>Wnt10a</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 10A	1.54	1.00e-02
<i>Slc18a3</i>	Solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 3	1.53	3.14e-03
<i>Aire</i>	Autoimmune regulator (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)	1.53	1.70e-02
<i>Lsp1</i>	Lymphocyte specific 1	1.53	5.58e-05
<i>Kcnh4</i>	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 4	1.53	2.69e-03
<i>Rbm38</i>	RNA binding motif protein 38	1.53	1.13e-02
<i>Abcc3</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	1.53	7.67e-05
<i>Tmem150a</i>	Transmembrane protein 150A	1.53	1.05e-03
<i>Doc2g</i>	Double C2, gamma	1.53	1.21e-02
<i>Gm4149</i>	Predicted pseudogene 4149	1.53	1.92e-03
<i>Muc1</i>	Mucin 1, transmembrane	1.53	9.74e-04
<i>W11-535J9.1</i>		1.53	3.13e-03
<i>Gpr17</i>	G protein-coupled receptor 17	1.53	6.04e-04
<i>Prkcg</i>	Protein kinase C, gamma	1.53	2.54e-08
<i>Id1</i>	Inhibitor of DNA binding 1	1.53	3.64e-03
<i>Six5</i>	Sine oculis-related homeobox 5	1.53	1.94e-03
<i>Card14</i>	Caspase recruitment domain family, member 14	1.53	8.22e-03

<i>Col9a3</i>	Collagen, type IX, alpha 3	1.53	3.19e-03
<i>Npc1l1</i>	NPC1-like 1	1.52	2.33e-03
<i>Efs</i>	Embryonal Fyn-associated substrate	1.52	3.42e-03
<i>Slc9a3</i>	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	1.52	1.24e-02
<i>Aebp1</i>	AE binding protein 1	1.52	2.11e-04
<i>Fam179a</i>	Family with sequence similarity 179, member A	1.52	2.76e-05
<i>Vgf</i>	VGF nerve growth factor inducible	1.52	1.01e-02
<i>Gm12963</i>	Predicted gene 12963	1.52	2.13e-02
<i>Tcirg1</i>	T cell, immune regulator 1, ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 protein A3	1.52	4.69e-04
<i>Eno3</i>	Enolase 3, beta muscle	1.52	9.77e-03
<i>Scx</i>	Scleraxis	1.52	9.63e-03
<i>Glis3</i>	GLIS family zinc finger 3	1.52	1.95e-05
<i>Cacna1h</i>	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	1.51	2.04e-03
<i>Siglecf</i>	Sialic acid binding Ig-like lectin F	1.51	2.16e-02
<i>Cd22</i>	CD22 antigen	1.51	1.73e-02
<i>Plekhn1</i>	Pleckstrin homology domain containing, family N member 1	1.51	2.35e-04
<i>Fibcd1</i>	Fibrinogen C domain containing 1	1.51	7.42e-04
<i>Ssh3</i>	Slingshot homolog 3 (Drosophila)	1.51	9.06e-04
<i>Tmie</i>	Transmembrane inner ear	1.51	2.19e-09
<i>Aim1l</i>	Absent in melanoma 1-like	1.51	3.86e-03
<i>Col20a1</i>	Collagen, type XX, alpha 1	1.51	1.01e-03
<i>Pbx4</i>	Pre B cell leukemia homeobox 4	1.51	1.03e-03
<i>RP23-50I16.2</i>		1.5	5.35e-03
<i>Id3</i>	Inhibitor of DNA binding 3	1.5	8.19e-03
<i>Rnf39</i>	Ring finger protein 39	1.5	2.19e-02
<i>Gm10030</i>	Predicted gene 10030	1.5	2.62e-03
<i>Prodh</i>	Proline dehydrogenase	1.5	9.07e-04
<i>Cnga2</i>	Cyclic nucleotide gated channel alpha 2	1.5	2.04e-02
<i>Arrdc1</i>	Arrestin domain containing 1	1.5	1.33e-03
<i>Crabp1</i>	Cellular retinoic acid binding protein I	1.5	2.98e-04
<i>Asb2</i>	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 2	1.5	5.00e-03
<i>1810020O05Rik</i>	Riken cDNA 1810020O05 gene	1.5	2.99e-03
<i>A930017K11Rik</i>	RIKEN cDNA A930017K11 gene	1.5	1.99e-02
<i>Rfx2</i>	Regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression)	1.5	5.24e-04
<i>Rab26</i>	RAB26, member RAS oncogene family	1.5	1.00e-05
<i>mt-Nd5</i>	Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 5	0.67	1.17e-03
<i>Gm32391</i>	Predicted gene, 32391	0.67	1.43e-03
<i>Gm37453</i>	Predicted gene, 37453	0.67	1.50e-03

<i>mt-Co1</i>	Mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I	0.67	9.75e-06
<i>2900052N01Rik</i>	RIKEN cDNA 2900052N01 gene	0.67	2.57e-04
<i>Lpo</i>	Lactoperoxidase	0.67	3.10e-04
<i>Ankrd34b</i>	Ankyrin repeat domain 34B	0.67	3.07e-06
<i>Cdk14</i>	Cyclin-dependent kinase 14	0.67	9.27e-06
<i>Gm26582</i>	Predicted gene, 26582	0.66	1.89e-02
<i>Gm20449</i>	Predicted gene 20449	0.66	1.09e-02
<i>Gm12696</i>	Predicted gene 12696	0.66	8.79e-04
<i>mt-Tw</i>	Mitochondrially encoded tRNA tryptophan	0.66	1.07e-02
<i>Ernm</i>	Ermin, ERM-like protein	0.66	5.54e-05
<i>Kcnh7</i>	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 7	0.66	1.92e-03
<i>Kcns3</i>	Potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3	0.66	1.36e-09
<i>Adgrl4</i>	Adhesion G protein-coupled receptor L4	0.66	1.63e-04
<i>Fam122b</i>	Family with sequence similarity 122, member B	0.66	3.22e-05
<i>Sc5d</i>	Sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	0.66	5.54e-06
<i>Gm9864</i>	Predicted gene 9864	0.66	8.44e-05
<i>Edil3</i>	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	0.66	8.65e-04
<i>Adam23</i>	A disintegrin and metallopeptidase domain 23	0.66	2.48e-08
<i>Gm9938</i>	Predicted gene 9938	0.66	1.42e-02
<i>Cubn</i>	Cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	0.66	6.96e-04
<i>Iigp1</i>	Interferon inducible GTPase 1	0.66	2.58e-02
<i>Dgkb</i>	Diacylglycerol kinase, beta	0.66	1.73e-03
<i>Olfm3</i>	Olfactomedin 3	0.66	2.47e-03
<i>Gm17732</i>	Predicted gene, 17732	0.66	8.92e-04
<i>Gm10568</i>	Predicted gene 10568	0.66	2.75e-03
<i>L3mbtl4</i>	L(3)mbt-like 4 ( <i>Drosophila</i> )	0.66	5.39e-04
<i>Abcb7</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7	0.66	7.29e-04
<i>Pcdh9</i>	Protocadherin 9	0.66	4.59e-04
<i>Serpinb1a</i>	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a	0.66	1.66e-05
<i>Gm17655</i>	Predicted gene, 17655	0.66	1.22e-02
<i>Zfp750</i>	Zinc finger protein 750	0.66	3.45e-03
<i>Lypla1</i>	Lysophospholipase 1	0.66	7.89e-04
<i>Gbp8</i>	Guanylate-binding protein 8	0.65	2.34e-02
<i>3632451O06Rik</i>	RIKEN cDNA 3632451O06 gene	0.65	1.53e-06
<i>Gm8104</i>	Predicted gene 8104	0.65	1.17e-02
<i>Hoxa13</i>	Homeobox A13	0.65	2.06e-02
<i>Hist2h4</i>	Histone cluster 2, H4	0.65	1.24e-02
<i>Kcna2</i>	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	0.65	7.61e-13

<i>Glrb</i>	Glycine receptor, beta subunit	0.65	3.26e-05
<i>Epn3</i>	Epsin 3	0.65	1.93e-04
<i>Hecw1</i>	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	0.65	5.43e-04
<i>Gm26653</i>	Predicted gene, 26653	0.65	2.12e-02
<i>Gm33366</i>	Predicted gene, 33366	0.65	5.83e-03
<i>Marveld3</i>	MARVEL (membrane-associating) domain containing 3	0.65	4.71e-03
<i>Wnt8b</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 8B	0.65	9.95e-03
<i>Mob3b</i>	MOB kinase activator 3B	0.65	1.62e-05
<i>Gm7292</i>	Predicted gene 7292	0.65	1.25e-03
<i>Podxl</i>	Podocalyxin-like	0.65	6.40e-06
<i>Ano3</i>	Anoctamin 3	0.65	6.17e-04
<i>Fam78a</i>	Family with sequence similarity 78, member A	0.64	1.89e-06
<i>mt-Nd2</i>	Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2	0.64	2.04e-05
<i>Dpy1911</i>	Dpy-19-like 1 ( <i>C. elegans</i> )	0.64	1.86e-04
<i>Uhmk1</i>	U2AF homology motif (UHM) kinase 1	0.64	1.85e-05
<i>Neurod4</i>	Neurogenic differentiation 4	0.64	4.96e-03
<i>Ugt8a</i>	UDP galactosyltransferase 8A	0.64	5.12e-04
<i>Clrn1</i>	Clarin 1	0.64	5.73e-03
<i>Dynlt3</i>	Dynein light chain Tctex-type 3	0.64	1.35e-06
<i>Pttg1</i>	Pituitary tumor-transforming gene 1	0.64	1.14e-02
<i>Tek</i>	Endothelial-specific receptor tyrosine kinase	0.64	3.27e-07
<i>Gm37111</i>	Predicted gene, 37111	0.64	6.62e-04
<i>Pm20d1</i>	Peptidase M20 domain containing 1	0.64	1.12e-05
<i>Gen1</i>	Gen homolog 1, endonuclease ( <i>Drosophila</i> )	0.64	2.32e-03
<i>Abcd2</i>	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	0.64	1.18e-06
<i>Hist1h2be</i>	Histone cluster 1, H2be	0.64	5.77e-04
<i>Klhl4</i>	Kelch-like 4	0.64	1.82e-04
<i>Gm13293</i>	Predicted gene 13293	0.63	1.47e-05
<i>Pmp2</i>	Peripheral myelin protein 2	0.63	1.44e-02
<i>AI317395</i>	Expressed sequence AI317395	0.63	9.93e-04
<i>St3gal6</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	0.63	2.06e-12
<i>Itgb3</i>	Integrin beta 3	0.63	1.28e-06
<i>Fbxo47</i>	F-box protein 47	0.63	1.68e-03
<i>4930578C19Rik</i>	RIKEN cDNA 4930578C19 gene	0.63	4.47e-04
<i>4930506C21Rik</i>	RIKEN cDNA 4930506C21 gene	0.63	6.58e-05
<i>Cep290</i>	Centrosomal protein 290	0.63	1.35e-04
<i>Trp53inp2</i>	Transformation related protein 53 inducible nuclear protein 2	0.63	1.09e-12
<i>Samd5</i>	Sterile alpha motif domain containing 5	0.63	8.19e-04

<i>Apln</i>	Apelin	0.63	3.99e-13
<i>A930006I01Rik</i>	RIKEN cDNA A930006I01 gene	0.63	1.07e-02
<i>5031414D18Rik</i>	RIKEN cDNA 5031414D18 gene	0.63	1.11e-07
<i>Gpd1</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	0.62	4.57e-10
<i>Slc38a5</i>	Solute carrier family 38, member 5	0.62	1.50e-03
<i>Nxph2</i>	Neurexophilin 2	0.62	2.58e-05
<i>Spag6l</i>	Sperm associated antigen 6 like	0.62	1.35e-04
<i>AW495222</i>	Expressed sequence AW495222	0.62	4.12e-04
<i>Olf287</i>	Olfactory receptor 287	0.62	5.07e-12
<i>Dusp19</i>	Dual specificity phosphatase 19	0.62	5.49e-05
<i>Gkn3</i>	Gastrokinase 3	0.62	3.39e-03
<i>Slc6a5</i>	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 5	0.62	1.59e-09
<i>Gm4951</i>	Predicted gene 4951	0.62	1.00e-02
<i>Tmtc2</i>	Transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 2	0.62	1.63e-07
<i>Esrrg</i>	Estrogen-related receptor gamma	0.62	2.12e-05
<i>Slc16a4</i>	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4	0.62	5.29e-05
<i>mt-Atp8</i>	Mitochondrially encoded ATP synthase 8	0.61	6.57e-03
<i>Kctd9</i>	Potassium channel tetramerisation domain containing 9	0.61	1.04e-10
<i>Eif5a2</i>	Eukaryotic translation initiation factor 5A2	0.61	9.53e-06
<i>Kcna1</i>	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1	0.61	4.17e-12
<i>Gm2093</i>	Predicted gene 2093	0.61	4.58e-03
<i>Eml1</i>	Echinoderm microtubule associated protein like 1	0.61	4.45e-08
<i>Gm2115</i>	Predicted gene 2115	0.61	1.26e-13
<i>Strip2</i>	Striatin interacting protein 2	0.61	5.21e-09
<i>2310069G16Rik</i>	RIKEN cDNA 2310069G16 gene	0.61	7.75e-07
<i>Cyrr1</i>	Cysteine and tyrosine-rich protein 1	0.61	1.30e-05
<i>Kcnc3</i>	Potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	0.6	1.85e-12
<i>Gbp3</i>	Guanylate binding protein 3	0.6	6.36e-04
<i>Kif5b</i>	Kinesin family member 5B	0.6	2.17e-08
<i>2610305D13Rik</i>	RIKEN cDNA 2610305D13 gene	0.6	1.04e-03
<i>Itga1</i>	Integrin alpha 1	0.6	3.52e-04
<i>Acvr1c</i>	Activin A receptor, type IC	0.6	7.00e-05
<i>Zfp820</i>	Zinc finger protein 820	0.6	8.44e-05
<i>Cxcl12</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	0.6	7.36e-06
<i>Rgs5</i>	Regulator of G-protein signaling 5	0.6	4.98e-11
<i>Ighm</i>	Immunoglobulin heavy constant mu	0.6	4.38e-03
<i>5430416O09Rik</i>	RIKEN cDNA 5430416O09 gene	0.6	5.46e-05
<i>Crygs</i>	Crystallin, gamma S	0.6	3.35e-03



<i>Six4</i>	Sine oculis-related homeobox 4	0.6	1.21e-05
<i>Etv1</i>	Ets variant 1	0.59	1.62e-06
<i>Gm21984</i>	Predicted gene 21984	0.59	4.78e-04
<i>Serpind1</i>	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade D, member 1	0.59	2.84e-05
<i>Sgpp2</i>	Sphingosine-1-phosphate phosphatase 2	0.59	5.61e-13
<i>1700008O03Rik</i>	RIKEN cDNA 1700008O03 gene	0.59	3.03e-07
<i>Ifi203</i>	Interferon activated gene 203	0.59	2.38e-03
<i>1700020I14Rik</i>	RIKEN cDNA 1700020I14 gene	0.59	5.37e-09
<i>Ptpnb</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	0.59	1.44e-10
<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	0.58	6.77e-07
<i>Ifi44</i>	Interferon-induced protein 44	0.58	2.12e-03
<i>RP23-76J15.4</i>		0.58	1.95e-03
<i>Mcf2</i>	Mcf.2 transforming sequence	0.57	6.68e-14
<i>Acan</i>	Aggrecan	0.57	3.67e-16
<i>Unc13c</i>	Unc-13 homolog C (C. elegans)	0.57	1.63e-07
<i>Tnfsf10</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	0.57	1.99e-04
<i>Cyp2j12</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 12	0.57	2.59e-08
<i>Dio2</i>	Deiodinase, iodothyronine, type II	0.57	4.57e-05
<i>Steap2</i>	Six transmembrane epithelial antigen of prostate 2	0.56	3.71e-13
<i>Slfn5</i>	Schlafen 5	0.56	6.62e-05
<i>mt-Nd6</i>	Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 6	0.56	8.12e-05
<i>Gm26633</i>	Predicted gene, 26633	0.55	4.21e-08
<i>Sptssb</i>	Serine palmitoyltransferase, small subunit B	0.54	2.30e-14
<i>Asah2</i>	N-acylsphingosine amidohydrolase 2	0.54	1.99e-08
<i>Scn4b</i>	Sodium channel, type IV, beta	0.54	3.16e-24
<i>Gm15512</i>	Predicted gene 15512	0.53	1.30e-05
<i>Gm26673</i>	Predicted gene, 26673	0.53	6.14e-16
<i>mt-Tm</i>	Mitochondrially encoded tRNA methionine	0.53	4.54e-05
<i>Btc</i>	Betacellulin, epidermal growth factor family member	0.52	1.30e-05
<i>4930432E11Rik</i>	RIKEN cDNA 4930432E11 gene	0.52	3.30e-05
<i>Smyd1</i>	SET and MYND domain containing 1	0.48	8.03e-08
<i>1500004A13Rik</i>	RIKEN cDNA 1500004A13 gene	0.48	3.29e-06
<i>Fbxo40</i>	F-box protein 40	0.48	3.36e-11
<i>Hsd11b1</i>	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	0.47	2.22e-18
<i>Hapln1</i>	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	0.46	9.82e-13
<i>Gm10684</i>	Predicted gene 10684	0.45	2.88e-08
<i>Gm4524</i>	Predicted gene 4524	0.45	3.39e-12
<i>Atp2b1</i>	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 1	0.43	1.64e-26
<i>Aqp6</i>	Aquaporin 6	0.42	4.09e-11

<i>Mybpc3</i>	Myosin binding protein C, cardiac	0.34	3.23e-13
<i>Chrna2</i>	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2 (neuronal)	0.27	1.70e-33
<i>A730020M07Rik</i>	RIKEN cDNA A730020M07 gene	0.27	8.75e-24

**Supplementary table 4 :** Genes with altered expression in CHMP2B<sup>intron5</sup> mice compared to non-transgenic littermates at end stage. Genes were selected as follow: adjusted *p*-value <0.05; FC<0.67 or >1.5.



## II. Caractérisation du modèle murin CHMP2B<sup>intron5</sup>

## ORIGINAL ARTICLE

# A transgenic mouse expressing CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia

Aurélia Vernay<sup>1,2</sup>, Ludivine Therreau<sup>1,2</sup>, Béatrice Blot<sup>3</sup>, Valérie Risson<sup>4</sup>, Sylvie Dirrig-Grosch<sup>1,2</sup>, Robin Waegaert<sup>1,2</sup>, Thiebault Lequeu<sup>1,2</sup>, François Sellaal<sup>1,5</sup>, Laurent Schaeffer<sup>4</sup>, Rémy Sadoul<sup>3</sup>, Jean-Philippe Loeffler<sup>1,2</sup> and Frédérique René<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U1118, Mécanismes Centraux et Périphériques de la Neurodégénérescence, F-67000 Strasbourg, France, <sup>2</sup>Université de Strasbourg, UMRS1118, Faculté de Médecine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France, <sup>3</sup>INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Université Joseph Fourier, F-38700 La Tronche, France, <sup>4</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, UMR5239 CNRS/ENS Lyon/UCBL/HCL Ecole normale supérieure de Lyon, F-69364 Lyon Cedex 07, France and <sup>5</sup>Neurology department, Hôpitaux civils and CMRR, F-68000 Colmar, France

\*To whom correspondence should be addressed at: Tel: +33 368853086; Fax: +33 368853065; Email: frederique.rene@unistra.fr

## Abstract

Mutations in the charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) are associated with frontotemporal dementia (FTD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and with a mixed ALS–FTD syndrome. To model this syndrome, we generated a transgenic mouse line expressing the human CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant in a neuron-specific manner. These mice developed a dose-dependent disease phenotype. A longitudinal study revealed progressive gait abnormalities, reduced muscle strength and decreased motor coordination. CHMP2B<sup>intron5</sup> mice died due to generalized paralysis. When paralyzed, signs of denervation were present as attested by altered electromyographic profiles, by decreased number of fully innervated neuromuscular junctions, by reduction in size of motor endplates and by a decrease of sciatic nerve axons area. However, spinal motor neurons cell bodies were preserved until death. In addition to the motor dysfunctions, CHMP2B<sup>intron5</sup> mice progressively developed FTD-relevant behavioural modifications such as disinhibition, stereotypies, decrease in social interactions, compulsivity and change in dietary preferences. Furthermore, neurons in the affected spinal cord and brain regions showed accumulation of p62-positive cytoplasmic inclusions associated or not with ubiquitin and CHMP2B<sup>intron5</sup>. As observed in FTD3 patients, these inclusions were negative for TDP-43 and FUS. Moreover, astrogliosis and microgliosis developed with age. Altogether, these data indicate that the neuronal expression of human CHMP2B<sup>intron5</sup> in areas involved in motor and cognitive functions induces progressive motor alterations associated with dementia symptoms and with histopathological hallmarks reminiscent of both ALS and FTD.

Received: February 5, 2016. Revised: June 6, 2016. Accepted: June 7, 2016

© The Author 2016. Published by Oxford University Press.

All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

## Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD) are two fatal neurodegenerative diseases belonging to the same pathophysiological continuum (1). ALS is the most frequent adult-onset motor neuron (MN) disease. It is characterized by a progressive muscle weakness evolving to paralysis, due to the gradual loss of skeletal muscle innervation reflecting degeneration of MNs in the motor cortex, brainstem and spinal cord. FTD, also referred to as frontotemporal lobar degeneration, is the most common cause of dementia after Alzheimer disease in people under the age of 65 years (2). It is characterized by the atrophy of the frontal and/or temporal cortices of the brain. These anatomical modifications are associated with behavioural changes and cognitive impairments such as alterations in personal and social conduct (i.e. disinhibition and/or apathy, stereotyped or compulsive behaviour, alteration in appetite or food preference). ALS and FTD are occasionally associated with Parkinsonism (3,4).

Although traditionally considered as distinct entities, it recently emerged that ALS and FTD share overlapping genetic causes, common physiopathological features and both diseases lie on a clinical, pathological and genetic continuum (5). Approximately 15% of FTD patients develop ALS and 10–20% of ALS patients develop FTD (6–10). In addition to this clinical overlap, ALS and FTD share common histopathological hallmarks such as neuronal ubiquitinated inclusions (1). Both ALS and FTD can be of sporadic or familial origin (10% and 30%, respectively). Several genes have been related to ALS, FTD or ALS–FTD. In the past 7 years, mutations in *chromatin-modifying protein 2* (CHMP2B) (11), *TAR DNA binding protein* (TARDBP) (12), *fused in sarcoma* (FUS) (13), *valosin-containing protein* (VCP) (14) or *C9orf72* (15,16) genes have been identified in ALS–FTD families.

CHMP2B was the first identified gene associated with both pathologies (11). CHMP2B belongs to the charged multivesicular body protein family. As a component of the endosomal sorting complex required for transport III (ESCRTIII) multi-protein complex, CHMP2B is involved in vesicular trafficking, autophagy (17–19) and dendritic spine formation and functionality (20,21). In 2005, the CHMP2B<sup>intron5</sup> mutation was discovered in a large Danish family of FTD. This mutation is a missense mutation in the splice acceptor site of exon 6 generating two distinct aberrant transcripts, CHMP2B<sup>intron5</sup> and CHMP2B<sup>A10</sup>, both part of which encode proteins with a defective C terminus (22). Since then, 11 new mutations in this gene have been found in ALS (11,23,24), FTD (22,25–27) and ALS–FTD (11) patients, supporting the idea of a pathological continuum. These mutations are disseminated throughout the sequence, irrespective of the considered pathology. However, the C-terminal region lacking in CHMP2B<sup>intron5</sup> also contained point mutation sites found in ALS (11,23) and FTD (22,27) patients, suggesting a common contribution of this region to both pathologies. To date, it is still unknown how mutations in the same gene can lead to distinct symptoms, ranging from pure muscle wasting in ALS to pure dementia in FTD. To determine whether the overexpression of the CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant in neurons can provoke ALS and/or FTD, we generated a transgenic line expressing this mutant under control of the mouse Thy1.2 promoter, a promoter known to be neuron specific and driving a strong expression in MN and cortical neurons (28). In 2012, Ghazi-Noori et al. (19) reported a transgenic (Tg) line expressing the same CHMP2B mutant under control of the hamster prion promoter that only exhibits progressive accumulation of protein aggregates and autofluorescent aggregates without motor or behavioural changes (29).

More recently, Gascon et al. (30) described another Tg mouse line with a forebrain-specific expression of the same mutation. This Tg line develops an age-dependent FTD phenotype with social and behavioural impairments without motor dysfunctions. Here, we report a Tg mouse line expressing the CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant in neurons that develops clinical and histopathological hallmarks of both ALS and FTD including gait abnormalities, motor function alterations and behavioural impairments. These mice also show neuromuscular junctions (NMJs) abnormalities, reactive gliosis and neuronal inclusions relevant of the histopathology described in ALS and FTD. Taken together, these data show that the C-terminal truncation of CHMP2B, a protein involved in endocytic trafficking, autophagic clearance of cellular protein and synaptic plasticity, can induce ALS and FTD. These data further support the hypothesis of a mechanistic continuum from MN disease to dementia. Because this mouse model of ALS–FTD based on a CHMP2B mutation recapitulates characteristic features of both pathologies, this line will be of great interest for investigation of common processes acting in ALS and FTD.

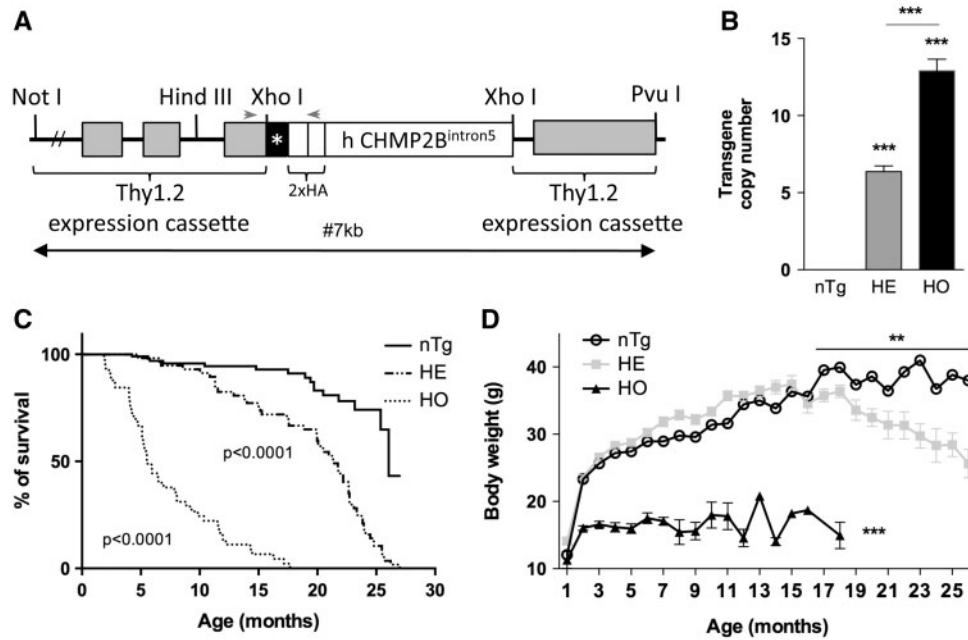
## Results

### Generation of a Tg mouse line expressing the human CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant

The Tg mouse line was generated using a DNA fragment coding for the human CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant cDNA, a mutant identified in human familial FTD (22), tagged with two hemagglutinin (HA) sequences. The linearized vector containing the cDNA inserted in the Thy1.2 expression cassette (Fig. 1A) was used for microinjection into one-cell embryos. One hundred and six live pups were analyzed by PCR for the presence of transgene, resulting in one male founder mouse.

The founder was successfully mated to establish the Tg line CHMP2B<sup>intron5</sup> and showed a stable transmission of the transgene at the expected Mendelian ratio. Hemizygous (HE) mice were interbred to obtain wild-type (nTg), HE and homozygous (HO) mice in the same litters. The integration site of the transgene was determined using the TLA strategy and located within chromosome 10: 98950250–98968278 in the *Atp2b1* locus gene within the large first intron. As shown in [Supplementary Material, Figure S1](#), *Atp2b1* mRNA levels were not significantly modified by the integration of the transgene in Tg mice although a trend of a decrease was found in HO mice. As determined by quantitative PCR (Fig. 1B), genomic DNA of HE mice contained six copies of the transgene per diploid cell and 12 copies in HO mice. Kaplan–Meier survival analysis revealed that HE and HO mice had a significant reduced survival when compared with their nTg littermates with a median survival of 21.3, 5.5 and 26 months, respectively (Fig. 1C). The mean lifespan of HO mice was four-times shorter than nTg littermates ( $7.5 \pm 0.88$  months versus  $23.6 \pm 1$  months,  $P < 0.0001$ ,  $n = 57$  and  $32$ , respectively), whereas the mean lifespan of HE mice was only shortened by 4 months when compared with nTg littermates ( $19.3 \pm 0.8$  versus  $23.6 \pm 1.1$  months,  $P < 0.0001$ ,  $n = 57$  and  $32$ , respectively).

Until 1 month of age, Tg mice were indistinguishable from their nTg littermates when observed by visual inspection. From 1 month of age, HO mice failed to gain weight normally, whereas the growth of HE mice was comparable with those of nTg littermates until 17 months of age, an age at which they begin to lose weight (Fig. 1D).



**Figure 1.** General characteristics of CHMP2B<sup>intron5</sup> transgenic mice. (A) Schematic representation of the sequence used to generate the CHMP2B<sup>intron5</sup> mouse line. Human CHMP2B<sup>intron5</sup> cDNA with an N-terminal dimeric HA tag sequence was subcloned in the mouse Thy1.2 expression cassette in frame with a Kozak sequence (\*). Arrowheads show the position of the primers used for genotyping. (B) Quantification of transgene copy number by qPCR. Genomic DNA of HE and HO mice contained, respectively,  $6.374 \pm 0.366$  and  $12.91 \pm 0.747$  copies of the transgene per diploid cell. Values represent the mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$ . \*\*\* $P < 0.0001$  one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD. (C) Survival curves showing median survival of 5.5, 21.3 and 26 months for HO, HE and nTg, respectively. HO and HE survival significantly differed from nTg. Log-rank Mantel-Cox test nTg:  $n = 122$ , HE:  $n = 66$ , HO:  $n = 42$ . Females and males were used with a 1:1 ratio. (D) HO mice (triangles) showed failure to gain weight from 4 weeks of age and were significantly leaner than their nTg (circles) and HE (squares) littermates. HE started to significantly lose weight from 17 months of age compared to their nTg littermates. Females and males were used with a 1-1 ratio. Values represent the mean  $\pm$  SEM,  $n = 122-10$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.0001$ , multiple t test.

### Expression profile and tissue distribution of the transgene

As shown by RT-PCR analysis (Fig. 2A), CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant mRNA was specifically expressed in the brain and the spinal cord and to a lesser extent in the lung and the thymus of HE mice and was not detectable in the liver and the skeletal muscle, in accordance with the Thy1.2 expression pattern described by Caroni (31). In the brain, CHMP2B<sup>intron5</sup> mRNA level was ~3-fold higher in HO than in HE mice showing the dosage effect of the number of transgene copies. When compared with endogenous mouse *Chmp2B* mRNA levels, CHMP2B<sup>intron5</sup> mRNA levels were similar in HE mice and 3.4-fold higher in HO mice (Fig. 2B).

This expression profile was confirmed by western blot analysis using an antibody directed against the HA-tag. CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant protein was specifically expressed in neuronal tissues of Tg mice (Fig. 2C), and transgene protein levels were ~2-fold higher in HO than in HE mice (Fig. 2D). In the same extracts, endogenous mouse CHMP2B was expressed in all tissues tested of nTg and Tg mice with levels comparable between the three genotypes (Fig. 2C and D).

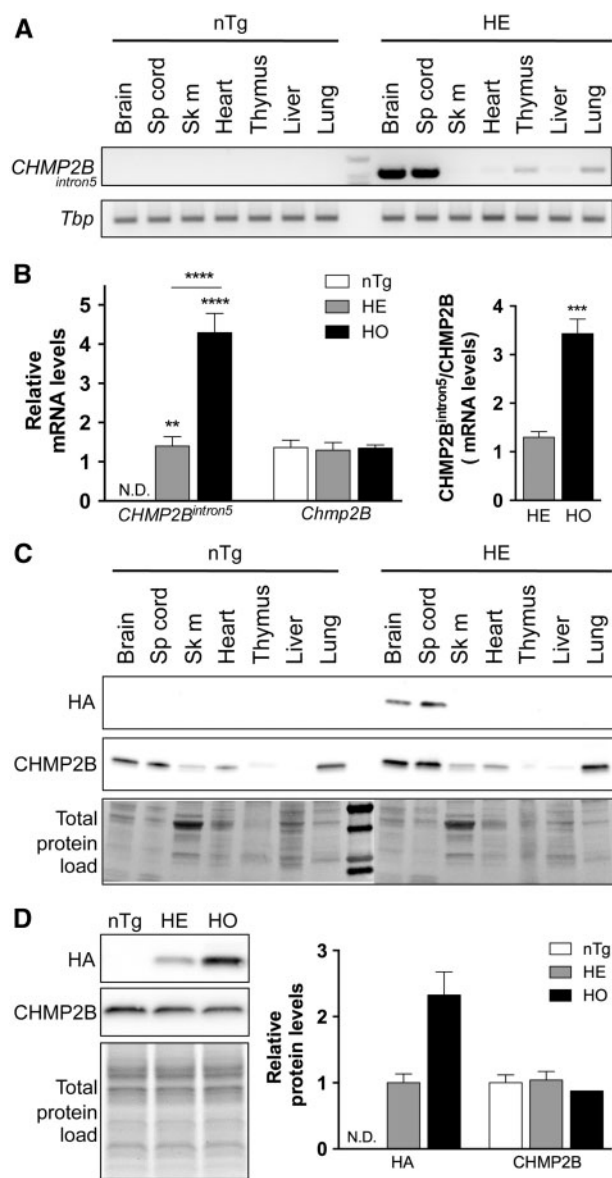
We further investigated the distribution of CHMP2B<sup>intron5</sup> in the brain and spinal cord by immunohistochemistry using an antibody directed against HA (Fig. 3A). HA immunoreactivity was detectable in almost all the regions of the brain (Table 1) with a high level of expression in the cortex, the thalamus, the amygdala, the pallidum and the brainstem. In the spinal cord, the large cells of the ventral horn corresponding to MNs were strongly labelled compared to the other neurons. To confirm the neuronal expression of the transgene, we performed a double labelling detecting simultaneously HA and NEU N, a neuronal

marker (Fig. 3B). In all regions of the brain and spinal cord studied, all HA-positive cells corresponding to the CHMP2B<sup>intron5</sup> expressing cells were positive for NEU N showing that CHMP2B<sup>intron5</sup> was exclusively expressed by neurons.

### CHMP2B<sup>intron5</sup> mice develop age- and dose-dependent cytoplasmic inclusions

Protein aggregates are a common denominator of ALS and FTD (32). In the brain regions expressing the transgene, cytoplasmic inclusions immunoreactive for p62, an ubiquitin-associated protein present in inclusions in the brain of patients, ubiquitin or HA were found in neurons (Table 2) and appeared as small (size < 1  $\mu$ m) or medium (1.5–3.5  $\mu$ m) dots, or large (>3.5  $\mu$ m) inclusions (Supplementary Material, Figure S2). Their abundance depended on brain structures and increased with age. We analyzed four regions of the brain containing neurons relevant for the pathologies: the frontal cortex, the thalamus, the brainstem and the spinal cord, and the *corpus callosum* a fibre tract. At 6 months of age, medium and large inclusions immunoreactive for p62 (Fig. 4 and Supplementary Material, Figure S3) and ubiquitin (Fig. 5 and Supplementary Material, Figure S4) were less frequent than small inclusions; their densities being higher in HO than in HE. The large HA inclusions were only present in spinal cord of HO mice (Fig. 6 and Supplementary Material, Figure S5). In 12-month-old HE mice, when compared with 6-month-old HE mice, the density and the size of p62 inclusions were mainly increased in the frontal cortex and the spinal cord, whereas ubiquitin and HA inclusions were higher in all structures except the corpus callosum where no HA inclusions were found (Supplementary Material,





**Figure 2.** CHMP2B<sup>intron5</sup> is expressed in nervous tissues of transgenic mice in a dose-dependent manner. (A) Transgene mRNA levels were measured in different tissues by semi-quantitative RT-PCR. Human CHMP2B<sup>intron5</sup> mRNA was detected in HE mice with high expression levels in the central nervous system. *Tbp* mRNA levels were used as loading controls. (B) Relative mRNA levels of transgene human CHMP2B<sup>intron5</sup> and endogenous mouse *Chmp2B* were measured by RT-qPCR in cortex and spinal cord extracts. Values represent the mean  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$  per genotype, \*\* $P < 0.005$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD. (C) CHMP2B<sup>intron5</sup> and CHMP2B protein levels were measured by western blot. HA staining corresponding to the transgene was only detected in the nervous tissue of HE mice. In contrast, CHMP2B was expressed at various levels in all tissues tested, irrespective of the genotype. Ponceau red showed the total proteins loaded in each lane. (D) Representative western blot showing CHMP2B<sup>intron5</sup> (HA) and CHMP2B protein levels in brain extracts (left) and the relative protein quantification measured by densitometry (right). Transgene level was two-fold higher in HO compared to HE mice, whereas CHMP2B level was not affected by the expression of the transgene. Total proteins loaded in each lane are shown in the lower panel. For quantification,  $n = 3$  per genotype. All tissues were obtained from 4-month-old mice. Sk m, skeletal muscle; Sp cord, spinal cord.

Figures S6–S8). At 24 months of age in HE mice, all the categories of inclusions were amplified when compared with nTg littermates or 12-month-old HE mice (Supplementary Material, Figures S6–S8). We then checked for a possible co-localization of

these proteins within the same inclusions. As shown in Figure 7 and Supplementary Material, Figure S9, inclusions immunoreactive for the transgene were recurrently also immunoreactive for p62 but less frequently for ubiquitin. As neuronal TDP-43 and FUS inclusions often occur in ALS and FTD patients, we looked for the presence of such inclusions in the brain of the CHMP2B<sup>intron5</sup> mice and showed a normal nuclear localization of both proteins (Supplementary Material, Figure S10).

### CHMP2B<sup>intron5</sup> mice develop a progressive reactive gliosis

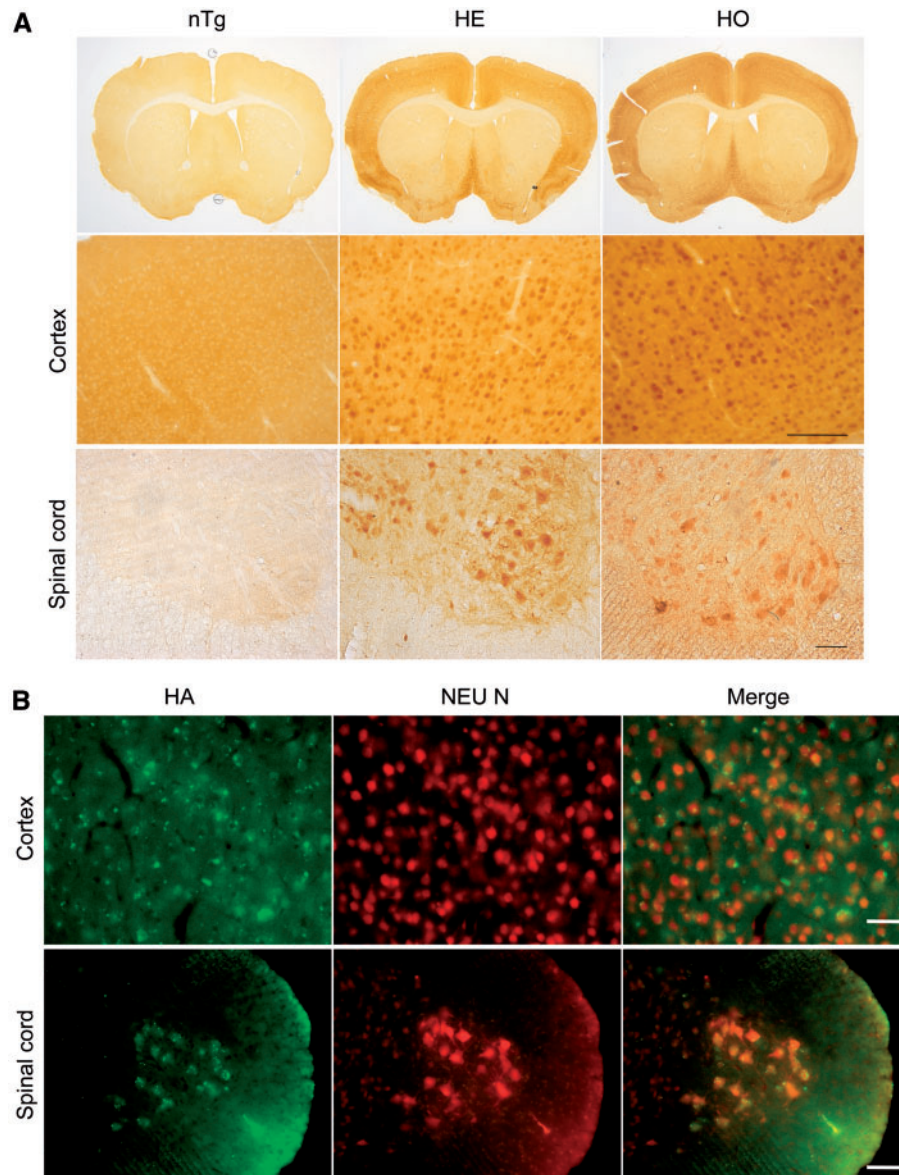
Reactive gliosis, a hallmark of neuronal damages, is another feature of ALS and FTD neuropathology (33,34). It is characterized by astrocytic hypertrophy and microglial proliferation. At the mRNA level, the astrocyte marker Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) was both induced in the cortex (Fig. 8) and in the spinal cord (Fig. 9) of 6-month-old HO mice and of 12-month and end-stage HE mice compared to nTg age-matched mice. This increase of *Gfap* mRNA expression was correlated with a higher density of astrocytes that became more developed and ramified (Figs 8 and 9 and Supplementary Material, Figures S11 and S12). In contrast, IBA1, a microglia-/macrophage-specific calcium-binding protein, was only increased at the mRNA levels in the spinal cord of HO mice at 6 months of age. A similar trend was found for HE mice at 12 months and end-stage. In the cortex, mRNA levels of *Iba1* remained unchanged. These changes at the mRNA levels were corroborated by the IBA1 immunostaining (Figs 8 and 9 and Supplementary Material, Figure S11 and S12) showing an increase of immunoreactivity in the spinal cord associated with an increased branching and lengthening of IBA1-positive cells processes.

Altogether, these results show a progressive dose- and age-dependent reactive gliosis, the astrocytic activation being more pronounced than the microglial activation.

### Overexpression of human CHMP2B<sup>intron5</sup> causes progressive motor impairments

To determine whether the neuron-specific expression of CHMP2B<sup>intron5</sup> induced phenotypic alterations related to ALS and FTD, general health and motor functions were assessed on a monthly basis starting at 1 month of age. As shown in Table 3, except for the weight, all parameters used to characterize the general health of the animals using the SHIRPA protocol were comparable between nTg and Tg mice. However, this analysis pointed towards alterations in motor functions and behaviour of Tg mice.

With time, HO mice progressively developed motor dysfunctions and gait alterations. They became unable to extend their hindlimb when held by the tail as early as 3 months (Supplementary Material, Figure S13A). HO also showed a change in footprint pattern with a 60%, 49% and 60% decrease in footstep length, width and diagonal, respectively, when compared with size-matched mice (Fig. 10A). Moreover, they exhibited an exaggerated spacing of hindlimb feet position and paw placement relative to the body axis when compared with size-matched nTg littermates (Fig. 10B); these changes becoming more pronounced with age. When tested on the accelerating rotarod at 3 months of age (Fig. 10C), HO mice presented with a significant two-third reduction of their motor capacities and a decrease by 25% of their muscle strength (Fig. 10D) when compared with nTg and HE mice. These changes were associated with the development of tremors



**Figure 3.** CHMP2B<sup>intron5</sup> is expressed in neurons of transgenic mice. (A) CHMP2B<sup>intron5</sup> was detected with an antibody against HA. A cytoplasmic labelling was specifically found in the brain and the spinal cord of HE and HO mice of 6 months of age, whereas tissues from age-matched nTg mice were devoid of specific staining. Scale bar: 50  $\mu$ m. (B) Double immunolabelling showing CHMP2B<sup>intron5</sup> detected with an antibody against HA (green), and neurons detected with an antibody against NEU N (red) in cortex and spinal cord of 6-month-old homozygous mouse. HA-positive cells were also immunoreactive for NEU N showing a specific expression of the transgene in neurons. Note the presence of HA aggregates in neurons. Scale bar: cortex: 25  $\mu$ m; spinal cord: 50  $\mu$ m.

and twitches (Fig. 10E and Table 3). Between 4 and 6 months, 70% of the HO mice presented an altered righting reflex when placed on the back (Fig. 10F).

With time, HO mice displayed signs of progressive hind limb paralysis associated with a severely stilted gait leading to death.

In contrast to HO, HE mice displayed no significant motor dysfunction or signs of illness until 10 months of age. From this age, HE mice progressively developed tremors and twitches (Fig. 10E and Table 3), showed a progressive reduction of their capacity to stay on the rotarod (Fig. 10C). HE muscle strength was significantly reduced at 18–20 months compared with nTg littermates when paralysis occurred (Fig. 10D).

Altogether, these results show a progressive age- and dose-dependent effect of CHMP2B<sup>intron5</sup> expression on motor functions reminiscent of ALS and Parkinsonism.

### Overexpression of human CHMP2B<sup>intron5</sup> results in impaired neuromuscular function and distal axonopathy

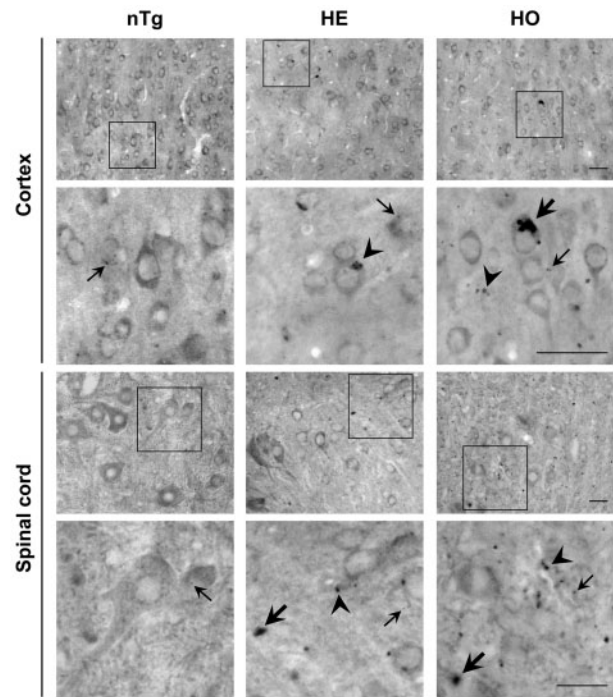
Progressive paralysis observed in ALS results from gradual denervation of skeletal muscles (35). To identify the origin of motor impairments described above, we focused on the motor units composed of the MNs, their axons and the associated skeletal muscles. We first used electromyography (EMG) to record electrical activity in skeletal muscle of anesthetized mice. Recording of the resting activity in the *gastrocnemius* muscle consistently revealed abnormal spontaneous activity with fibrillation potentials of HO and HE mice when paralysis occurred (Fig. 11A). Numerous fasciculations were also observed. At the end stage, 80% of the Tg mice presented with an altered EMG profile

**Table 1.** Distribution and relative levels of transgene immunoreactivity in the central nervous system of adult hemizygous mice

Brain area	Structure	HA staining
Cerebral cortex	Cingulate cortex	+++
	Motor cortex	++
	Somato-sensory cortex	++
	Pyramidal cortex	+++
	Entorhinal cortex	+++
	Corpus callosum	-
Limbic system	Dentate gyrus	++
	CA1	++
	CA2	+
	CA3	++
	Amygdala	+++
	Thalamus	+++
Basal ganglia	Hypothalamus	-/+
	Striatum	-
	Pallidum	+++
	Substantia nigra	+(+)
Brainstem	Red nucleus	+++
	Superior Colliculus	+/-
	Periaqueductal gray	++(+)
	Reticular nucleus	+++
	Pons	++
	Medulla	+++
Cerebellum	Molecular layer interneurons	-/+
	Purkinje cells	-
	Granule cells	-/+
Spinal cord	Motor neurons	+++

—: No staining; -/+ : faint staining; +: low staining; ++ moderate staining, +++ strong staining.

suggesting muscle denervation. We then measured muscle mRNA levels of the myogenin and the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor (AChR $\alpha$ ), two molecular markers both induced following denervation (36,37). As shown by RT-qPCR analysis (Fig. 11B), mRNA levels of *myogenin* and *AChR $\alpha$*  were, respectively, increased by 3- and 2-fold at 6 months and 5- and 2-fold at 12 months in HO mice when compared to nTg littermates. In HE mice, a significant increase was only detected at end stage when paralysis is established. We then further assessed the innervation state of the neuromuscular junctions (NMJ) using *tibialis anterior* muscle bundles. Presynaptic terminals were labelled using an anti-synaptophysin antibody, and AChRs of the post-synaptic endplates were revealed using fluorescent  $\alpha$ BGT. Figure 11C represents typical appearance of normal, partially denervated and denervated NMJs observed by confocal microscopy. At 12 months of age, the number of denervated or partially denervated NMJs was 70% and 40% higher in HO and HE mice, respectively, than in nTg littermates (Fig. 11D). At the end stage of HE mice (20–24 months of age), when hindlimb paralysis was established, only 16% of the NMJs were fully innervated, the rest being partially or even entirely denervated. In addition, the morphology of the AChR clusters of post-synaptic endplates was also altered (Fig. 11E). In 12-month-old HE muscle, the classical pretzel-like shape of AChR clusters was less complex and more fragmented. These abnormalities were more pronounced at end stage. However, the endplate surface remained comparable to nTg littermates. In parallel of these changes located at the level of NMJ, the proportion of large myelinated axons (>20  $\mu$ m<sup>2</sup>) in the sciatic nerve was decreased while the number of small calibre myelinated axons ( $\leq$ 10  $\mu$ m<sup>2</sup>) was increased (Fig. 12A and B) in HE and HO mice when compared to



**Figure 4.** p62 inclusions in cortex and spinal cord of 6-month-old CHMP2B<sup>intron5</sup> mice. High magnification of inset is shown below each picture. At 6 months of age, p62 inclusions were larger and more frequent in HO mice when compared to HE mice. In nTg mice, only very few small inclusions were seen in the studied structures. Arrows and arrowhead show representative inclusions. Small arrow: small size inclusion ( $\leq$ 1  $\mu$ m), arrowhead: medium size inclusion (1.5–3.5  $\mu$ m), large arrow: large size inclusion (>3.5  $\mu$ m). Scale bar: 25  $\mu$ m.

age-matched littermates. We then wondered whether the motor phenotype observed was due to MNs loss. Counting MNs in the ventral horns of lumbar spinal cords from 12 months and end-stage mice (Fig. 12C and D) revealed that the number of MNs in ventral horn of the spinal cord was similar in the three genotypes as was their age-related decrease.

Altogether these results indicate a distal alteration of the neuronal function, with partial muscle denervation without MNs loss.

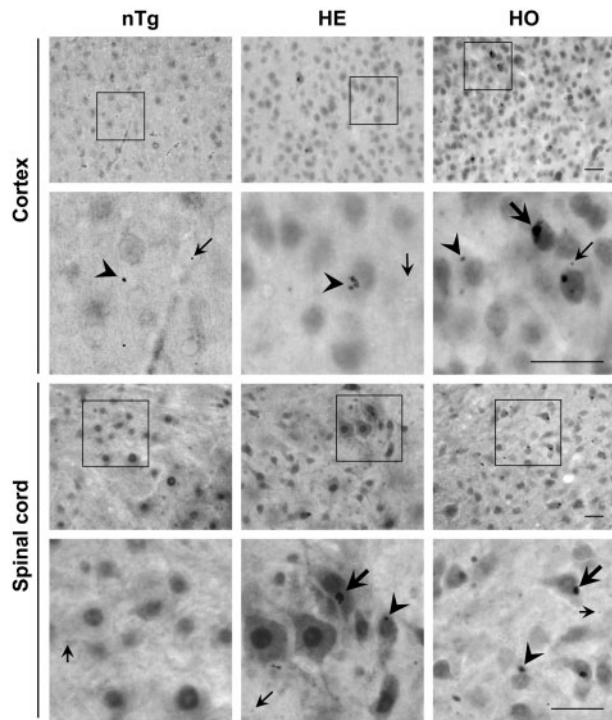
### CHMP2B<sup>intron5</sup> mice develop behavioural alterations

We then investigate more precisely whether the CHMP2B<sup>intron5</sup> mice developed behavioural changes related to FTD. We performed a series of tests aimed at modelling the most representative symptoms of FTD in mice (38).

Because FTD patients frequently present with restlessness, lack of concentration and disinhibition, the exploratory behaviour of the mice was evaluated in an open-field arena. As shown in Fig. 13A, HO mice had atypical patterns of exploration characterized by frequent changes of direction. They spent more time in the centre of the open field although all genotypes had the same level of locomotion (Fig. 13B). In addition, HO mice made less rearings, but rearings appeared preferentially in the centre of the arena compared to nTg and HE mice (Fig. 13C). At 12 months of age, HE mice also spent more time in the centre but rearings were comparable to those of nTg mice (Fig. 13C).

Stereotypic behaviours are commonly described in FTD patients and appear early in the course of the disease. In their homecage, at 4–6 months of age, all HO mice presented with

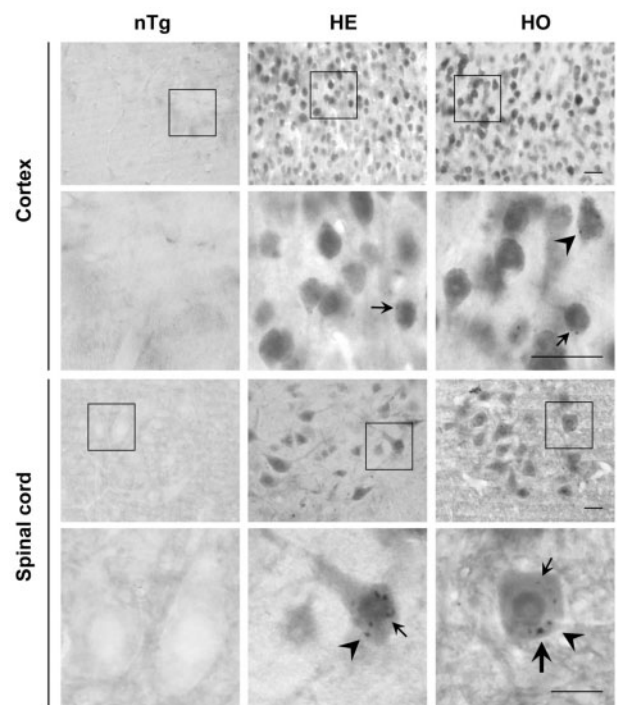




**Figure 5.** Ubiquitin inclusions in cortex and spinal cord of 6-month-old CHMP2B<sup>intron5</sup> mice. High magnification of inset is shown below each picture. At this age, ubiquitin inclusions were larger and more frequent in HO mice when compared to HE mice. In nTg mice, very few medium and small inclusions were found in the frontal cortex, and small inclusions were rare in the spinal cord. Arrows and arrowheads show representative inclusions. Small arrow: small size inclusion ( $\leq 1 \mu\text{m}$ ), arrowhead: medium size inclusion (1.5–3.5  $\mu\text{m}$ ), large arrow: large size inclusion ( $>3.5 \mu\text{m}$ ). Scale bar: 25  $\mu\text{m}$ .

stereotyped behaviour, whereas this was less frequent for HE and absent for nTg mice (Table 3). Upright scrabbling, repetitive burying (Fig. 14A) or relentless chewing of a piece of food were systematically observed in HO mice. In addition, repetitive head flicking, ‘kangaroo-like’ position (mouse in up-right position, sat on his rear) and repetitive face and ear cleaning were recurrently observed. We further quantified two types of social interaction (nose contact and crawl over) and saw a decrease of social interaction of HO mice with their cage mates, whereas HE behaved as nTg mice did (Fig. 14B). Because changes in food consumption and/or preference are frequently seen in FTD patients with a marked preference for sweetened food or drink, we then measured the daily food intake of the mice. At 5 months of age, HO mice ate more and spent more time visiting food pellets than nTg and HE mice (Fig. 14C). Interestingly, HE mice presented with the same alterations of food behaviour at 12 months of age. To test whether 5-month-old Tg mice developed change in preference to sweetened drink, we used the two bottles paradigm (Supplementary Material, Figure S13B). We observed that for all tested sucrose concentrations, HE and nTg mice showed a comparable preference for the sucrose solution. Until 2% sucrose concentration in drinking water, HO mice behaved like their littermates. However, when tested with 2% and 4% sucrose solution HO mice exhibited a lower preference for the soft drink than the nTg and HE mice.

Altogether, these results show a progressive and dose-dependent effect of CHMP2B<sup>intron5</sup> expression on behaviour reminiscent with FTD.

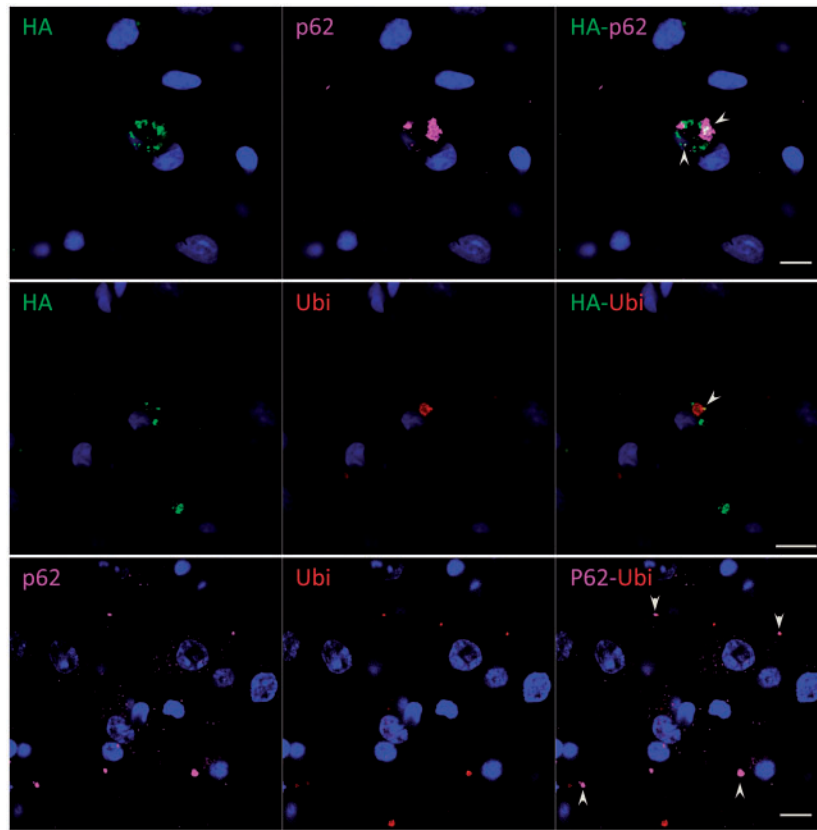


**Figure 6.** HA inclusions in cortex and spinal cord of 6-month-old CHMP2B<sup>intron5</sup> mice. High magnification of inset is shown below each picture. At this age, HA inclusions were of small or medium size except for the spinal cord of HO mice, where large size inclusions were detected. Arrows and arrowheads show representative inclusions. Small arrow: small size inclusion ( $\leq 1 \mu\text{m}$ ), arrowhead: medium size inclusion (1.5–3.5  $\mu\text{m}$ ), large arrow: large size inclusion ( $>3.5 \mu\text{m}$ ). Scale bar: 25  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

In this study, we reported the generation and the detailed characterization of the first transgenic mouse line expressing the CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant in neurons that developed motor, behavioural and histopathological hallmarks of both ALS and FTD. This indicates that the truncation of the C-terminal region of CHMP2B can contribute to the development of both pathologies as suggested by the point mutation sites in this region found in ALS (11,23) and FTD (22,27) patients. In the CNS, CHMP2B is mainly expressed in neurons, with a high level of expression in the frontal and temporal lobes of the cortex, the hippocampus, the brainstem and the cerebellum (22,21). For this reason, we selected the mouse thy1.2 promoter to drive the expression of our CHMP2B<sup>intron5</sup> construct. This promoter has been used before to express other proteins in Tg mice and is known to be highly active in the neuronal populations that normally express CHMP2B (31,28). Despite the large number of microinjected eggs, only one founder was obtained. To rule out the potential interfering effect of the transgene localization within the genome on the phenotype, we determined the integration site of the transgene. The TLA approach allowed to localize the transgene within the large first intron of the *Atp2b1* gene that encodes for a plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA1). In this gene, the first intron separates the 5'-untranslated exon 1 from the exon containing the translational start codon. Okunade et al. (39) found that loss of both copies of the *Atp2b1* gene caused embryonic lethality in mice, whereas heterozygous mutants had no overt phenotype. Here, we showed that in CHMP2B<sup>intron5</sup> mice, *Atp2b1* mRNA levels were not significantly different from those of nTg mice, thus





**Figure 7.** HO neurons contain cytoplasmic inclusions positive for HA, p62 and ubiquitin. Double immunolabelling HA (green)-p62 (magenta) (top), HA (green)-Ubiquitin (Ubi, red) (middle) and p62 (magenta)-Ubi (red) (bottom). Cortical neurons of 6-month-old HO mice contained cytoplasmic inclusions of various size positive for HA, p62 or ubiquitin. Nuclei were labelled with DraQ5 (blue). Arrowheads show colocalizations of selected markers in the same inclusions. Scale bar: 10  $\mu$ m.

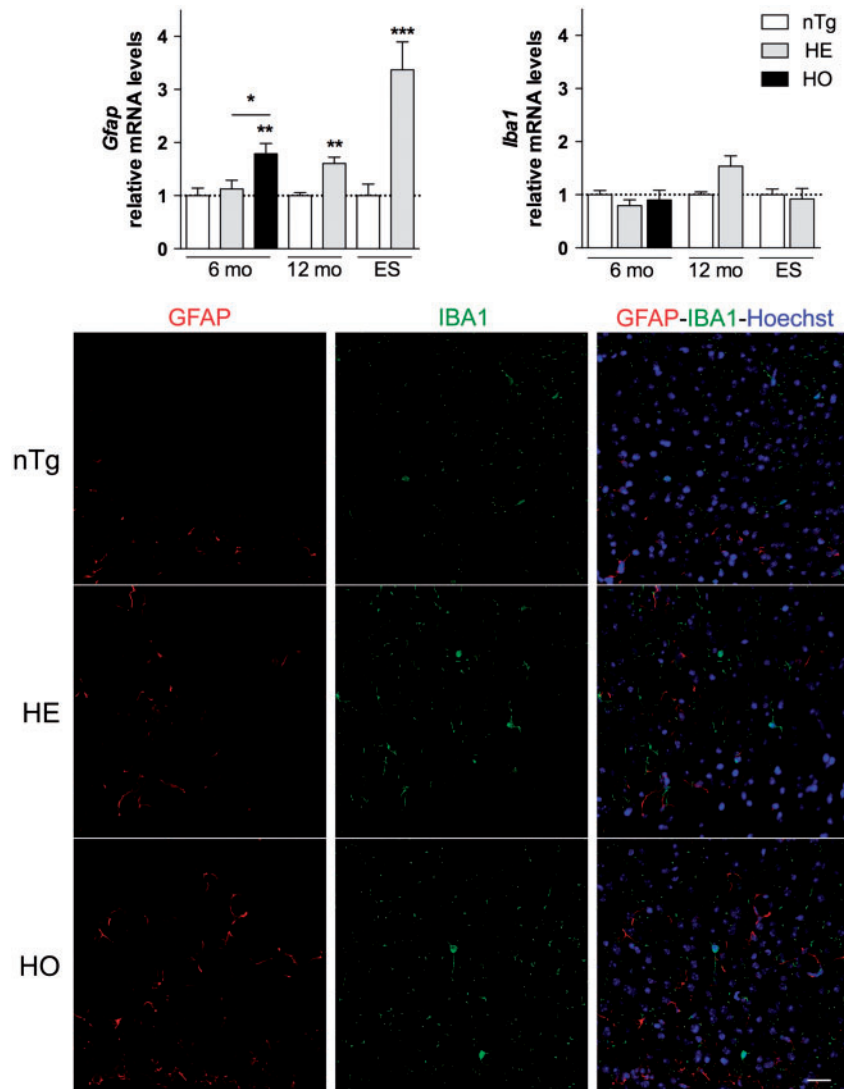
**Table 2.** Distribution and relative quantification of p62-, ubiquitin- and HA-positive inclusions in nTg and CHMP2B<sup>intron5</sup> Tg mice

Brain area	WT 6 months			HE 6 months			HO 6 months			WT 12 months			HE 12 months			WT 24 months			HE 24 months		
	p62	Ubi	HA	p62	Ubi	HA	p62	Ubi	HA	p62	Ubi	HA	p62	Ubi	HA	p62	Ubi	HA	p62	Ubi	HA
Frontal cortex	..	.	X	..	..	..	...	...	..	..	.	X	...	...	..	..	.	X	....	....	...
Corpus callosum	.	.	X	.	.	X	.	..	X	X	X	X	..	..	X	..	..	X	..	..	X
Thalamus	..	.	X	..	..	..	..	..	..	..	..	X	..	..	..	..	..	X	....	....	..
Brainstem	.	.	X	..	..	..	..	..	..	..	.	X	..	..	..	..	..	X	....	....	..
Spinal cord	.	.	X	..	..	..	....	....	..	.	.	X	..	..	..	..	.	X	....	....	.

Inclusions were quantified after immunoperoxidase staining at the indicated age as follow: x: no inclusion; ..: small size inclusion ( $\leq 1\mu$ m); •: medium size inclusion (1.5-3.5 $\mu$ m); ●: large size inclusion  $\geq 3.5\mu$ m. For each size, the number of dots reflects their relative density. ..: very low density;...: low density; ...: medium density; ....: high density.

the integration site cannot account for the phenotype observed in our Tg mice. Difficulties in producing constitutively expressing transgenic animals appear to be a general feature of both CHMP2B<sup>intron5</sup> and wild-type CHMP2B models. Indeed, Ghazi-

Noori et al. (19) obtained only two Tg lines for each construct using the hamster prion promoter, a promoter that drives strong expression in neurons in the hippocampus, in Purkinje cells in the cerebellum, and not only in few other neuronal populations

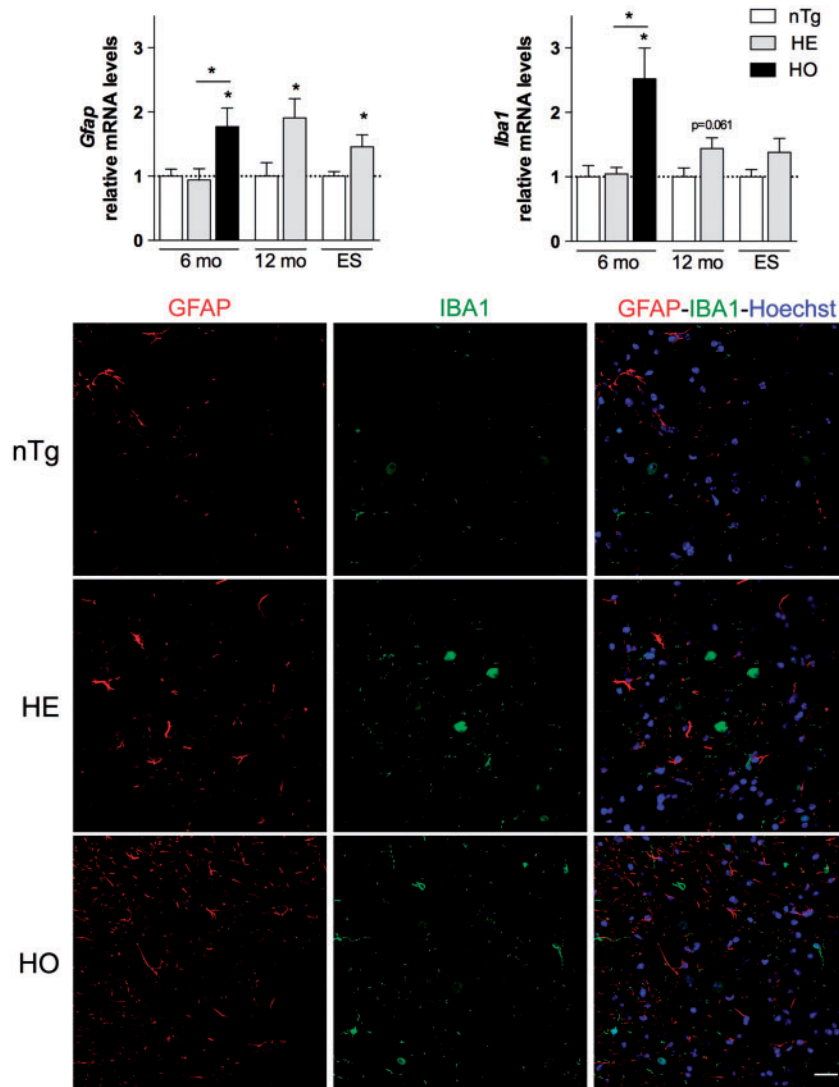


**Figure 8.** Astrocytosis increases in cortex of CHMP2B<sup>intron5</sup> Tg mice. (A) Quantification of *Gfap* (left) and *Iba1* (right) mRNA levels in cortex of nTg, HE and HO mice at 6 and 12 months of age and at ES. Graphs represent mean fold change  $\pm$  SEM from age-matched nTg  $n = 5-8$ . *P*-values versus nTg: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0005$ , one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD (6 months) or Student's *t* test (12 months and ES). (B) Representative photomicrographs showing GFAP and IBA1 immunoreactivities in cortex of nTg, HE and HO mice at 6 months of age. Note the increase of GFAP immunoreactivity in HO mice compared to HE and nTg mice. Scale bar: 25  $\mu$ m. ES, end stage.

but also in other peripheral cell types. More recently, Gao's laboratory reported three founders using the CamK2 promoter, which drives the expression of the transgene in the forebrain neurons (30). Interestingly, the same difficulties were encountered for other genes involved in MND or FTD such as TDP43 or Fus (40–42) suggesting a potential early toxicity of genes related to neurodegenerative process during development, irrespective of the promoter used.

In the brain of our Tg mice, at the mRNA levels, *Chmp2B*<sup>intron5</sup> expression was comparable to those of the mouse endogenous *Chmp2B* mRNA in HE mice, and  $\sim 3$ -fold higher in HO mice. These relative levels are higher than those described in FTD3 patients (18) but comparable to those obtained by the study of Ghazi-Noori *et al.* (19) in their HO CHMP2B<sup>intron5</sup> mice or more recently by Gascon *et al.* (30) in their Tg line expressing CHMP2B<sup>intron5</sup> in a forebrain-specific manner. The transgene expression correlates with the reported tissue-dependent Thy1.2 promoter activity (28). As a consequence, structures involved in FTD (frontal cortex,

amygdala and thalamus) (43) or ALS (motor cortex, brainstem and spinal cord) displayed a high expression of mutant CHMP2B<sup>intron5</sup>, whereas brain regions that in human disease are spared from FTD pathology such as the cerebellum, hypothalamus or striatum, did not express significant levels of transgene. Expression of the transgene is associated with the progressive development of histological hallmarks characteristics of both ALS and FTD. Indeed, the neuron-restricted expression of CHMP2B<sup>intron5</sup> progressively leads to the formation of cytoplasmic inclusions that are ubiquitin and p62 positive, and TDP-43 and FUS negative, as described in FTD3 patients (11,44,45) and in two others CHMP2B<sup>intron5</sup>-based Tg models (19,30). Moreover, CHMP2B<sup>intron5</sup> mice also developed brain and spinal cord reactive gliosis that progresses with time as described for ALS, FTD and ALS-FTD patients (46–49). This area- and neuron-specific expressions of CHMP2B<sup>intron5</sup> and the associated histopathology that progresses with age may thus account for an ALS-FTD phenotype reminiscent of the human disease.



**Figure 9.** Astrocytosis and microgliosis increase in spinal cord of CHMP2B<sup>intronic5</sup> Tg mice. (A) Quantification of *Gfap* (left) and *Iba1* (right) mRNA levels in spinal cord of nTg, HE and HO mice at 6 and 12 months of age and at ES. Graphs represent mean fold change  $\pm$  SEM from age-matched nTg  $n = 5-8$ . P-values versus nTg: \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD (6 months) or Student t test (12 months and ES). (B) Double immunolabelling showing GFAP (red) and IBA1 (green) immunoreactivities in spinal cord of nTg, HE and HO mice at 6 months of age. Nuclei were labelled with Hoechst 33346 (blue). Note the increase of GFAP and IBA1 immunoreactivities in HE mice compared to nTg mice. Scale bar: 25  $\mu$ m.

In patients, CHMP2B mutation carriers typically present with behavioural variant of FTD characterized by stereotyped or repetitive behaviours, hyperorality, hyperactivity or impulsivity, impaired social interactions and apathy (50). These changes in behaviour can be accompanied by motor symptoms related to ALS (11) and associated with Parkinsonism features such as gait impairment, rigidity or tremors (49,26,27). The CHMP2B<sup>intronic5</sup> mice presented here displayed age-dependent and dose-dependent changes in their behaviour that recapitulate the main symptoms of FTD. Indeed, these mice progressively developed stereotypies (climbing on the cage walls, digging in the bedding, playing with food pellet, repetitive head flicking and face and ears cleaning, kangaroo-like position), compulsive behaviour (overeating behaviour) associated in HO mice with a decrease of craving for sucrose, and decreased social interactions in their homecage. Interestingly, although food intake was increased in HO mice, these mice have a lower body mass and showed a lower ability to gain weight. This observation is not

unprecedented because it has been previously reported in SOD1(G86R) mice, an ALS model, and it may thus represent an integrate feature of ALS disease (51). Several mechanisms may account for this observation. The stereotypies observed are associated with an increased motor activity that may increase energy expenditure and prevent weight gain. Alternatively, an increased energy expenditure as described in ALS mouse models and in ALS patients (51,52) could also be responsible for the reduced weight gain. Very recently, Ahmed *et al* (53) also suggested that similar mechanisms of increased metabolic rate could explain the limited increase of BMI in bvFTD patients with abnormal eating behaviours. Stereotyped-related behaviour (excessive grooming) and impairment in sociability have also been described in the mouse model of FTD harbouring the CHMP2B<sup>intronic5</sup> mutant in forebrain neurons (30) supporting the crucial role of this brain area in these behaviours. The moving pattern of HO mice in an open field suggests a lack of concentration and the decrease of thigmotaxis, the natural tendency of

**Table 3.** Longitudinal modified SHIRPA analysis of nTg and CHMP2B<sup>intronic5</sup> Tg mice

	4–6 months			10–15 months			20–25 months	
	nTg(n = 16)	HE(n = 15)	HO(n = 10)	nTg(n = 16)	HE(n = 13)	HO(n = 5)	nTg(n = 8)	HE(n = 13)
<b>General health</b>								
Body weight (g)	27.1 ± 0.5	27.5 ± 0.5	16.2*** ± 0.57	33.9 ± 2.0	36.0 ± 0.7	17.0*** ± 0.7	38.3 ± 1.1	32.1*** ± 0.62
Skin color	N	N	N	N	N	N	N	N
Piloerection (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimation (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Palpebral closure	N	N	N	N	N	N	N	N
Body tone	N	N	N	N	N	N	N	N
Abdominal tone	N	N	N or ↓	N	N	↓	N	↓ or N or ↑
<b>Motor and sensory functions</b>								
Gait	N	N	A	N	N/A	A	N	A
Limb tone	N or ↑	N or ↑	N or ↓	N or ↑	N or ↑	↓ or ↑	↑	↑
Pelvic elevation	N	N	↑	N	N or ↓	↑	N	↓
Tremors (%)	0	30	80	18	33.3	100	25	100
Twiches (%)	0	36.4	60	0	53.8	100	0	91
Stereotypies	0	0	100	0	20	100	0	50
Pinna reflex	N	N	N	N	N	N	N	N
Corneal reflex	N	N	N	N	N	N	N	N
Delayed visual placing (%)	0	0	20	0	0	60	0	9.1
Positional passivity	N	N	N	N	N or ↓	N	N or ↓	↓
Altered righting reflex	0	0	70	0	39	80	0	80
Provoked biting (%)	78	90	30	78	77	0	43	55
Vocalization (%)	0	0	0	0	0	0	0	0

Analyses were performed at the indicated ages. A: altered; N: normal; ↓: decreased; ↑: increased. Value: % of mice presenting the studied character or mean ± SEM  
\*\*\*P < 0.0001 one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

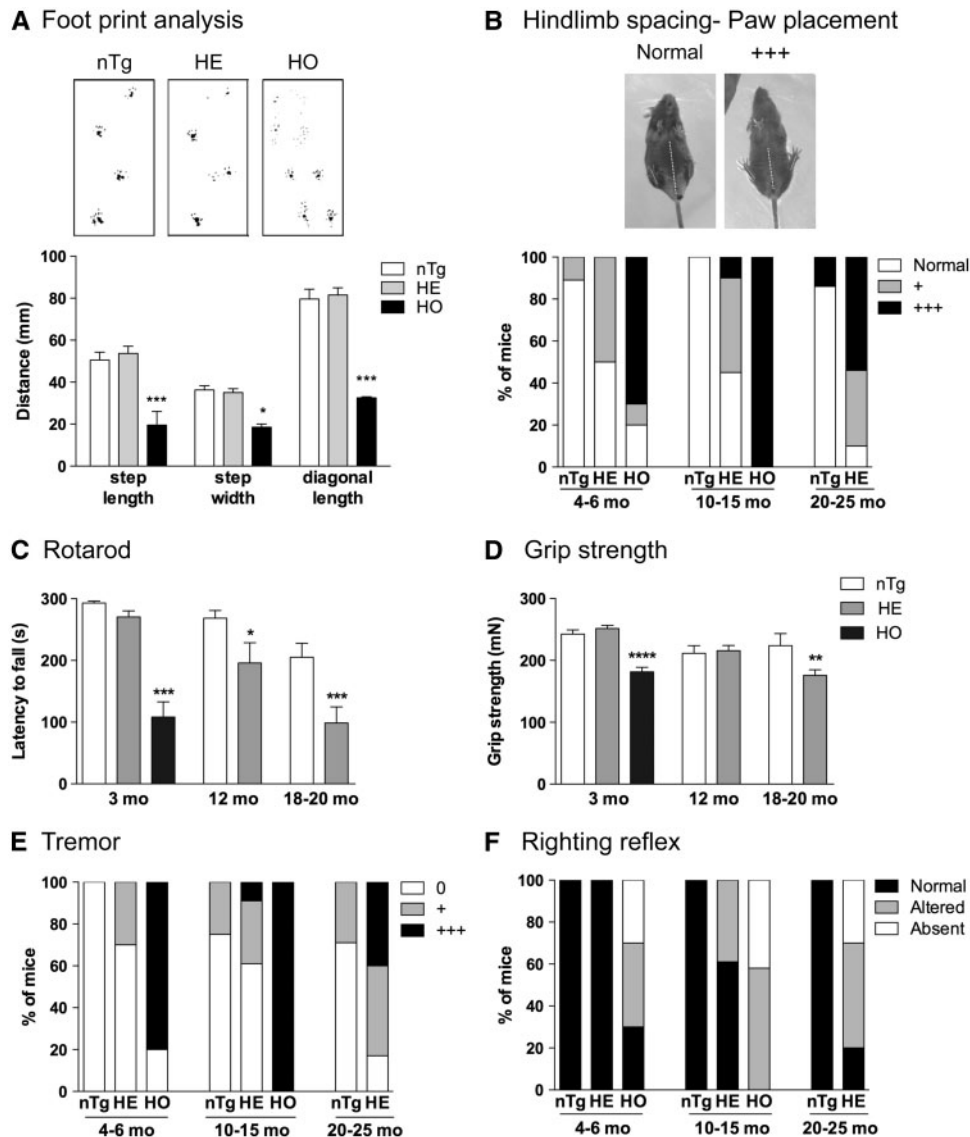
wall-seeking in an open-field, together with the increased proportion of rearing in the centre of the arena could relate to less emotional mice or to a state of disinhibition. With age, signs of apathy (delayed visual placing, decreased provoked biting) were also observed. All these changes correspond to the clinical symptoms developed by behavioural variant of FTD patients and support the idea that neuronal populations outside the forebrain might participate to the pathology.

In addition to these behavioural deficits, the CHMP2B<sup>intronic5</sup> mice displayed an age- and dose-dependent loss of the motor functions. As early as 3 months of age, HO mice exhibited gait abnormalities, impairment of hindlimb placement and extension and tremors reminiscent of ataxia and Parkinsonism described in some FTD and ALS patients (4,50). Their motor coordination and their muscle strength were also progressively altered. The progressive muscle weakness and paralysis in these mice mirrored motor symptoms of ALS patients. However, the motor phenotype in the CHMP2B<sup>intronic5</sup> mice was not associated with spinal MN loss. Denervation was mild, and detectable by EMG only at the late stage of the pathology. Although spinal MNs loss is considered a cardinal feature of ALS in patients and in mutant SOD1-based ALS mouse models, several studies indicated that it is the dysfunction of the NMJs rather than the loss of MNs that triggers the muscle denervation. Indeed, in these models as in patients, NMJ dysfunction and dismantlement is one of the first pathologic events in the course of the disease (35,54–57). Moreover, protecting MN cell body from the death by pharmacological or genetic approaches is not sufficient to prevent the denervation process and the progression of the disease (58,59). In our model, we show molecular and cellular clues indicative of an alteration of the NMJs namely induction of AChR $\alpha$  and myogenin that are characteristics of muscle denervation. Further, at the disease end stage, when EMG recordings detect spontaneous

activity of denervation, 70% of the NMJs presented with a partial retraction of the nerve terminals. It is of interest to note that a neuron-specific expression of a mutant SOD1 in mice induces the same motor phenotype without significant MNs degeneration (60–62). This is in contrast to the SOD1 models where the mutants are expressed ubiquitously and the MNs are lost (63,64).

Several mechanisms could support the distal degeneration of MNs and the behavioural impairments observed in the mice. CHMP2B is involved in several cellular processes related to protein clearance and membrane remodelling. As shown in the other two CHMP2B<sup>intronic5</sup>-based Tg lines and in this study, neuronal expression of CHMP2B<sup>intronic5</sup> in mice led to protein aggregation and cytoplasmic inclusions (19,30) possibly due to dysfunction of autophagy (17). These neuronal inclusions might impair the axonal transport and induce neuronal dysfunction as already shown in the ALS mice models (65–67). Over time, the accumulation of these aggregates might become progressively toxic for the neurons and induce their degeneration. In addition, several studies have demonstrated that CHMP2B<sup>intronic5</sup> impaired dendritic spines formation and synaptic plasticity (20,21) thereby driving synaptic dysfunctions and excitotoxicity. More recently, it has been shown that CHMP2B mutations were associated with lysosomal storage pathology (29). Because all these mechanisms are relevant in the context of ALS and FTD and could account for the development of the pathology, they will be explored in this model.

In conclusion, we showed that a human FTD3-linked mutant, the CHMP2B<sup>intronic5</sup> specifically expressed in neurons, can trigger ALS and FTD-like symptoms together with characteristic histopathological hallmarks of these two diseases. This demonstrates that the C-terminal part of CHMP2B is involved in common processes possibly causing ALS and FTD when altered. To date, the exact cellular and molecular mechanisms leading to



**Figure 10.** Overexpression of CHMP2B<sup>introns5</sup> in neurons results in age- and dose-dependent motor dysfunctions. (A) Top, Representative footprint of 3-month-old mice showing an altered stance of HO mice. Bottom, Quantitative footprint analysis showing a significant decrease in all parameters measured for HO mice when compared to HE or nTg size-matched mice. nTg: *n* = 9, HE: *n* = 6, HO: *n* = 5. \*\*\**P* < 0.0001, \**P* < 0.05, one way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD. (B) Representative example of hind limb spacing and paw placement (top) and analysis of hindlimb spacing (bottom) at three stages. The white lines on the mouse pictures represent the body axis and the paw's axis. Histograms represent the percentage of mice in the population displaying a normal paw placement in the axis of the body (normal), a slightly increased spacing of the paw compared to the body axis (+) or a large spacing of the paw compared to the body axis (+++). HO mice presented with increased hindlimb feet spacing as early at 4–6 months, these changes being more pronounced at 10–15 months. In HE mice, these changes appeared more progressively. nTg: *n* = 9–5, HE: *n* = 13–6, HO: *n* = 6. (C) Rotarod test showing an age-dependent and transgene copy number-dependent impairment in performance on the rotarod starting from 3 months of age for HO mice and 12 months of age for HE mice. Values represent the mean ± SEM, nTg: *n* = 9–5, HE: *n* = 13–6, HO: *n* = 6. *P*-values versus nTg: \*\*\**P* < 0.0001; \**P* < 0.05, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD. (D) Grip test analysis showing an age-dependent and transgene copy number-dependent decrease of grip strength. Values represent the mean ± SEM, nTg: *n* = 20–5, HE: *n* = 27–9, HO: *n* = 9. *P*-values versus nTg: \*\*\**P* < 0.0001; \**P* < 0.05, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD. (E and F) Tremors (E) and righting reflex (F) at three stages. Results are expressed as the percentage of mice displaying the studied parameter in the population. HO mice presented with increased tremors, and decreased righting reflex as early at 4–6 months, these changes being more pronounced at 10–15 months. In HE mice, these changes appeared more progressively. nTg: *n* = 9–5, HE: *n* = 13–6, HO: *n* = 6.

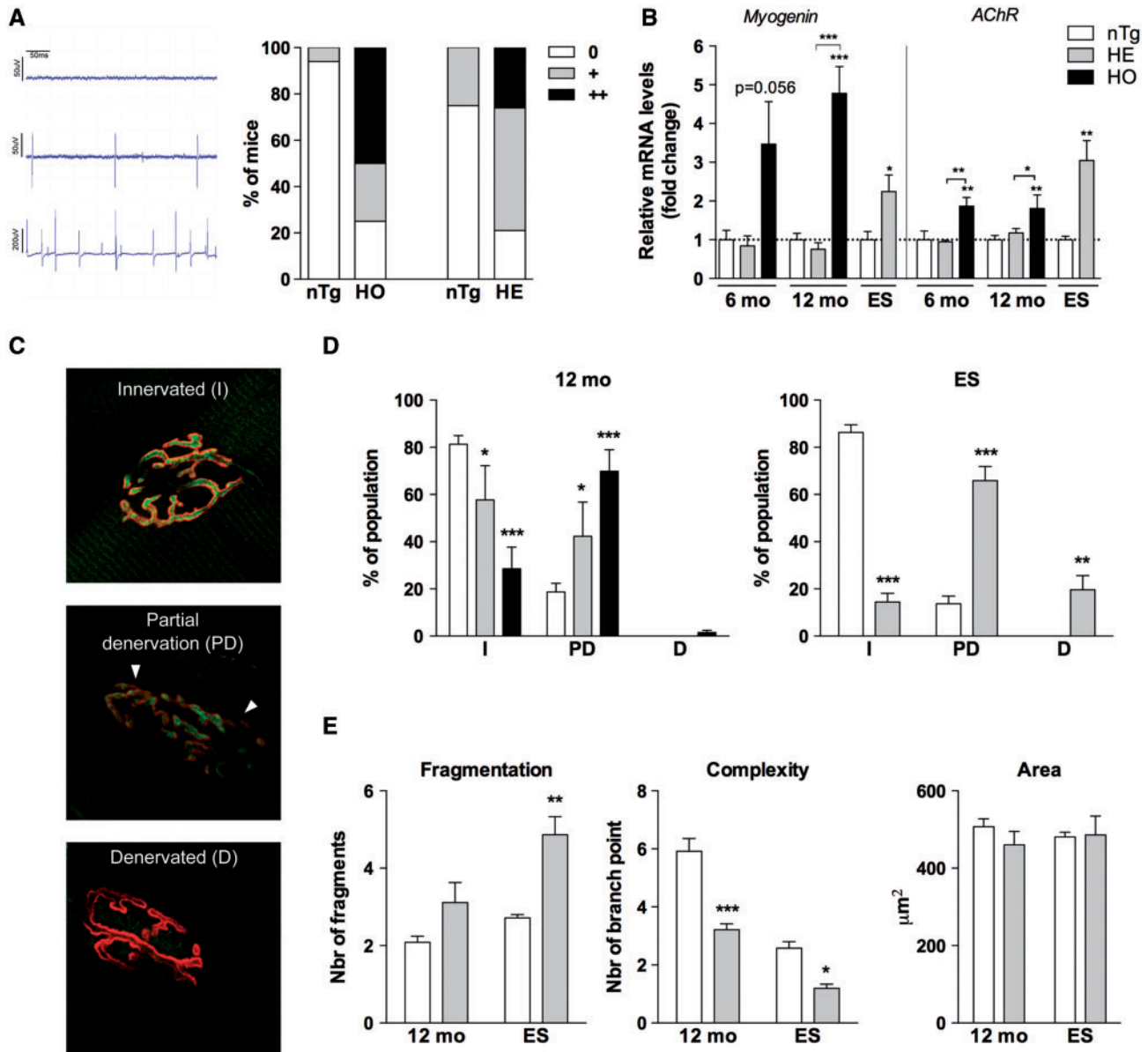
this phenotype remain to be elucidated. This unique transgenic line developing ALS and FTD symptoms will now allow to study the mechanistic continuum and the pathological processes shared by these two pathologies. Understanding the way a CHMP2B mutation leads to neurodegeneration might open new avenues for the discovery of therapeutic targets for these two diseases with currently no cure.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All experiments followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU). They were approved by the regional ethics committee CREMEAS 35 under No. AL/51/58/02/13 and were performed by authorized investigators.



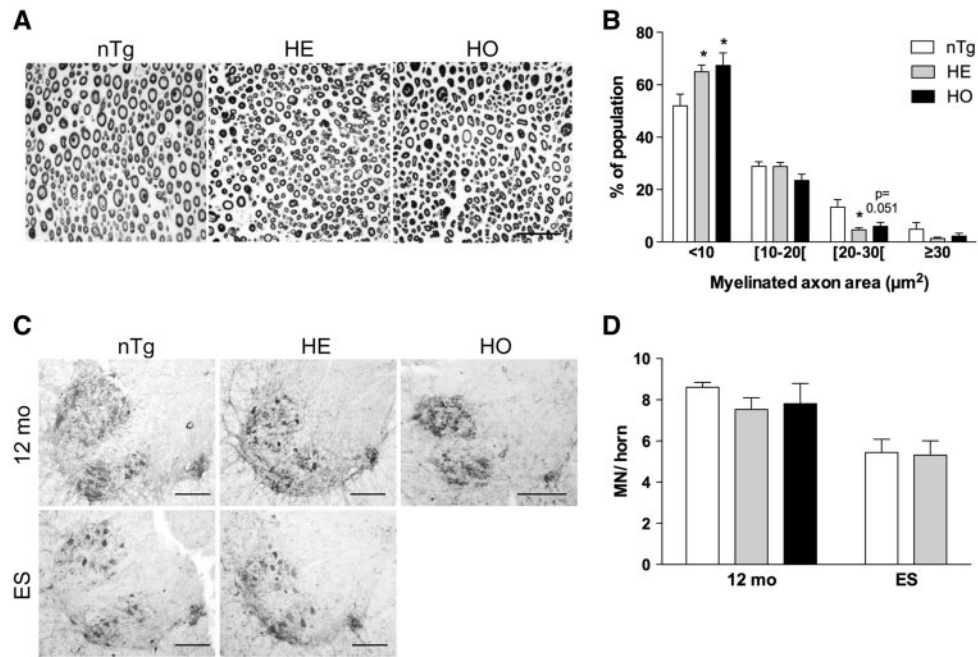


**Figure 11.** CHMP2B<sup>intron5</sup> Tg mice develop a distal axonopathy. (A) Left: Representative EMG recording used for scoring the mice. 0: normal profile without abnormal electrical activity, 1: presence of few fasciculations; 2: Fasciculations and fibrillations are present. Fasciculations and fibrillations are indicative of muscle fibre denervation and motor unit degeneration. Right: Percentage of mice presenting with abnormal EMG recording according to the above scale at end-stage. nTg: n=8; HE: n=19; HO: n=8. (B) mRNA levels of denervation markers *myogenin* and *AChR $\alpha$*  in *gastrocnemius* muscle at 6 and 12 months of age and at end-stage (ES) when mice were paralyzed. Denervation markers were significantly induced in HO and HE mice of, respectively, 6 and 12 months of age compared to nTg littermates. Values are the mean  $\pm$  SEM, nTg: n=9–6, HE: n=10–5; HO n=6–4. P-values versus nTg: \*P<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*<0.0001, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD. (C) Representative confocal photographs showing typical innervated (I) partially denervated (PD, arrowhead), and denervated (D) neuromuscular junctions in *tibialis anterior*. TRITC-bungarotoxin labelled acetylcholine receptors delineate motor endplates (red), nerve terminals are labelled by immunodetection of synaptophysin (green). (D) Quantification of innervation in nTg, HE and HO mice at 12 months of age and at ES. Histograms represent the mean  $\pm$  SEM, n=5 per genotype and age. P-values versus nTg: \*P<0.05, \*\*P<0.005, \*\*\*P<0.0001, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD. (E) Morphometric analysis of the motor endplate formed by AChR clusters in *tibialis anterior* of HE and nTg mice at 12 months of age and ES. Histograms represent the mean  $\pm$  SEM, n=6 and 5 mice per genotype at, respectively, 12 months and ES. P-values versus nTg: \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001, one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD.

### Generation of CHMP2B<sup>intron5</sup> tg mice

A cDNA encoding the N-terminal HA-tagged human CHMP2B<sup>intron5</sup> mutant was generated by PCR and has been described in details earlier (20). This cDNA was subcloned into the Xho I site in the mouse Thy1.2 promoter construct [generous gift from Dr. P. Caroni (31)]. The linearized Not I- Pvu I fragment was purified and injected into single-cell eggs of FVB/N mice breed with B6D2 males. The injected eggs were cultured

to the two-cell stage and then surgically transferred to recipient. Of three series of microinjections, one male founder was obtained. F1 was obtained by breeding the founder with C57Bl6 females. The line was then propagated on this mix background. HE mice were interbred to obtain wild-type non-Tg (nTg), HE and homozygous (HO) mice in the same litters. In all the experiments, unless indicated, littermates were used for comparisons.



**Figure 12.** Soma of motor neurons are preserved although sciatic nerve shows signs of degeneration. (A) Representative photomicrographs of myelinated axons within the sciatic nerve of nTg, HE and HO mice at the end-stage. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . (B) Distribution of myelinated axons area. The number of small calibre axons increases in HO and HE mice compared to nTg littermates while the number of large calibre axons decreases. Histograms represent the mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$  per genotype.  $P$ -values versus nTg: \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD. (C) Representative photomicrographs of CHAT immunostaining showing motor neurons in lumbar spinal cord of nTg, HE and HO mice at 12 months of age and at end stage (ES). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . (D) Quantification of the number of motor neurons (MN) in lumbar spinal cord of nTg, HE and HO mice at 12 months of age and at ES stage after CHAT immunostaining. Histograms represent the mean  $\pm$  SEM.

### Genotyping, determination of integration site and transgene copy number evaluation

Sequences of primers used are given in [Supplementary Material, Table S1](#). Tg mice were identified by PCR amplification of DNA extracted from tail biopsies. Determination of transgene copy number was performed using the protocol described by Joshi et al (68) with the following modifications: genomic DNA was extracted from tail biopsies of nTg, HE and HO mice with the phenol/chloroform method, followed by an ethanol precipitation. The linear fragment of 1079 bp containing the transgene was obtained by digestion with the restriction enzymes *Afl*2 and *Nsi*1 and purified with the Invitrogen gel extraction kit (Invitrogen). The molecular mass of the fragment was calculated using the formula:  $m = (1079 \text{ bp} \times 607.4 + 157.9) / 6.02 \cdot 10^{23}$ . A dilution series of the fragment was prepared in Tris buffer plus 20 ng/ $\mu\text{l}$  of genomic DNA from a nTg mouse.

The integration site was determined by Cergentis (Utrecht, Netherlands) using the Targeted Locus Amplification (TLA) Technology (69). Briefly, two primers pairs were designed and used in individual TLA amplifications. PCR products were purified and library prepped using the Illumina NexteraXT protocol and sequenced on an Illumina Miseq sequencer. Reads were mapped using BWA-SW alignment tool. The mouse genome version mm10 was used for mapping.

The transgene copy number was estimated by quantitative PCR (SSoAdvanced SYBR® green Supermix Bio-Rad, CFX96 Real-Time System, Bio-Rad), by comparing the cycle threshold of 100 ng of genomic DNA from transgenic mice with the plasmid fragment standard curve. CHMP2B<sup>intron5</sup> copy number per diploid cell was calculated by dividing the number of copies measured by  $1.67 \cdot 10^4$ , the number of diploid cells corresponding to 100 ng DNA.

### Breeding and maintenance

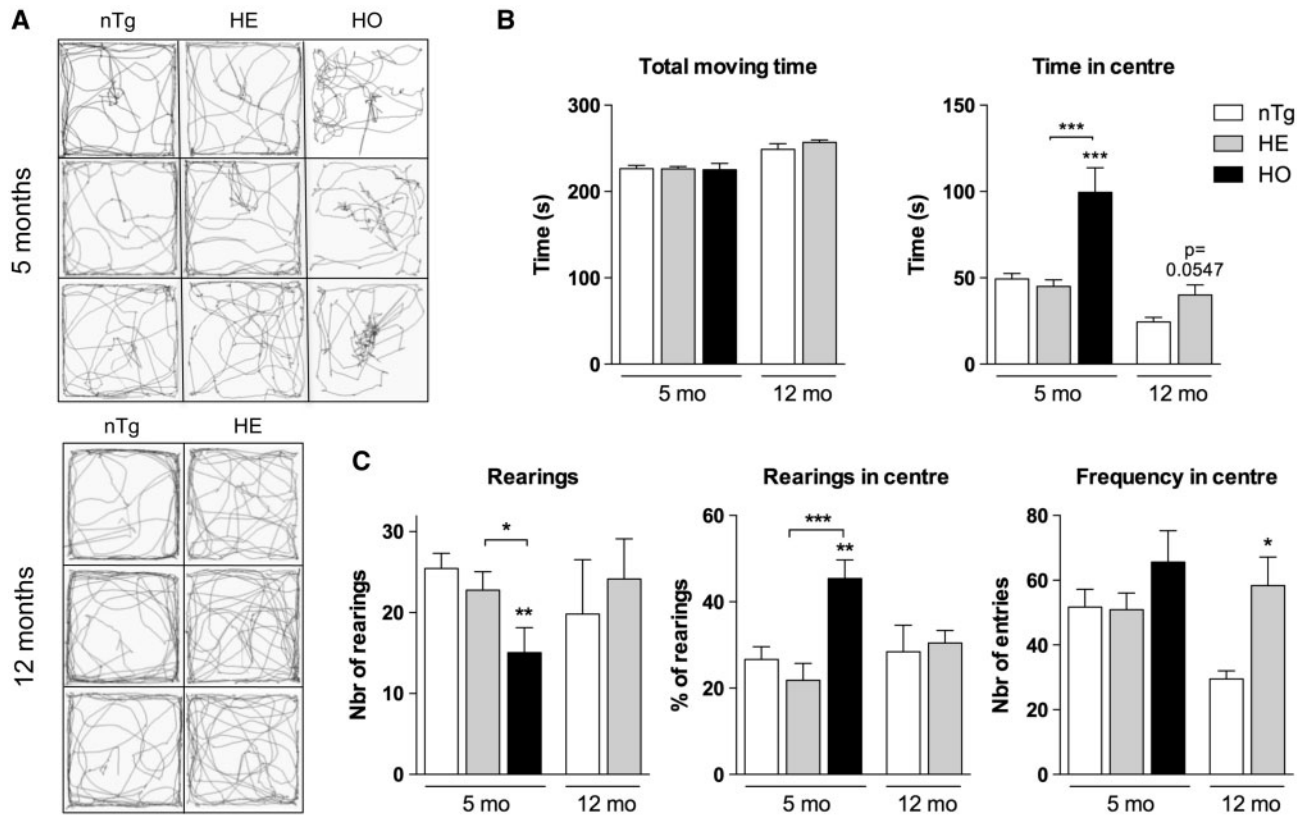
Mice were housed in the animal facility of the faculty of medicine of Strasbourg University, at 23°C with a 12-hour light/dark cycle. They had water and regular A04 rodent chow *ad libitum*. For survival experiments, mice were euthanized when animals were paralyzed and unable to roll over within 5 seconds after being pushed on their back.

### Phenotypic evaluation

Experiments were conducted by an observer who was blinded to the genotype of the mice. Females and males were used in this study with a 1:1 ratio. All Tg offspring were evaluated alongside their age- and sex-matched nTg littermates.

### General assessment

Mice were weighted monthly. To grossly characterize the phenotype of the mice, they were subjected to a modified SHIRPA (SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College School of Medicine at St Mary's; Royal London Hospital, St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment) protocol consisting of an initial battery of tests adapted from Rogers et al. (70). These tests consisted of a series of tests for non-invasive, rapid and quantitative assessments of autonomic, sensory and motor integrity in mice using standard methods such as open field, jar view and grid tests to provide a behavioural and functional profile. Stereotypies were examined in view jar and open-field arena. Stereotypies were considered to be present when at least two of the following behaviours were observed five times or more during the 5-minute sessions: upright scrabbling, kangaroo-like



**Figure 13.** CHMP2B<sup>introns5</sup> Tg mice show behavioural modifications in open-field arena. (A) Representative tracks of 4 (top) and 12 (bottom) month-old mice recorded during 3 minutes in open-field. Note the altered pattern of HO mice compared to HE and nTg mice at 4 months. Similar change was observed for HE compared to nTg mice at 12 months of age. (B) Quantification of the total moving time (left) and the time spent in the centre (right) during a 5-minute period in the open-field. The moving time was similar for the three genotypes, but the HO mice spent more time in the centre of the arena at 5 months of age compared to HE and nTg. HE mice tended to behave in a similar manner at 12 months of age. (C) The number of rearings (left) over the same period as in (B) was reduced in HO mice compared to HE and nTg mice while their percentage of rearing in the centre (middle) was increased. Note that at 12 months of age, the number of entry in the centre was increased in HE mice compared to nTg littermates (right). Graphs represent the mean  $\pm$  SEM,  $n = 6-12$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$  one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD. For detailed procedures, see Material and Methods.

position, repetitive head flicking, repetitive face and ears cleaning. Upright scrabbling was defined as a mouse rearing along a wall or in a corner and appearing to run or climb on place (71). Kangaroo-like position was defined as a mouse sat on his rear in up-right position. All tests were performed in the same order for each mouse under appropriate behavioural testing conditions. Mice were evaluated between 3–6, 10–15 and 20–25 months of age. The exact age or period is indicated in the figure legends.

#### Motor assessment

Mice motor performances were assessed using Rotarod (model 7650, Ugo Basile). Each session consisted of three trials of 330 seconds with an acceleration period (4–40 rpm during 180 seconds) followed by 150 seconds at constant maximal speed. Results are the mean of 4 consecutive sessions performed after habituation. Muscle strength was determined using a gripmeter (ALG01; Bioseb). The mouse was placed over a metallic grid that it instinctively grab to try to stop the involuntary backward movement carried out by the manipulator until the pulling force overcomes their grip strength. After the animal loses its grip, the strength-meter scores the peak pull force. The muscle force (in mN) was measured three times per mouse. Results are the mean of three consecutive assays.

#### Behavioural assessment

Food consumption was followed up over a 12-day period in individual cages, and the amount of food eaten was measured daily. Five behaviours were analyzed in home cage: upright scrabbling, digging in the bedding, nose contact and visits to pellet. Thirty minutes before recording, the home cage was placed in the area of recording and several pellets of regular food were placed on the ground in the cage. Mice were recorded for 15 minutes, and the behaviour of each mouse was analyzed separately. Crawl over corresponded to subject's forelimbs crossing the midline of the dorsal surface of the other mouse (72). General exploratory locomotion and anxiety were tested in an open-field arena ( $72 \times 72 \times 36$  cm) during 15-minute sessions. The floor was divided into sixteen  $18 \times 18$  cm<sup>2</sup> and a central square ( $18 \times 18$  cm<sup>2</sup>) was drawn in the middle of the open field. The maze was located in a test room lit by a 600 lux for background lighting. The open field maze was cleaned between each mouse using 70% ethyl alcohol. For the test, the mouse was placed in the centre of the arena and allowed to freely move while being recorded by an overhead camera. Behaviour was analyzed with an automated tracking system (EthoVision XT, Noldus). The time spent in the centre (four central quadrants) versus the perimeter (12 peripheral quadrants) were automatically calculated and was used to measure exploration and anxiety. The total moving time was used to evaluate locomotor



activity. For each mouse, a tracking trajectory map presenting corresponding locomotion activity was made.

### EMG

EMG recordings were made using a standard apparatus (Alpine Biomed) as previously described (73,74). Mice were anesthetized with a solution of ketamine/xylazine (100–16 mg/kg) injected intraperitoneally and kept on an heating pad to maintain a physiological muscle temperature (at about 31°C). A concentric needle electrode (no. 9013S0011, diameter 0.3 mm; Medtronic) was inserted in the selected muscle, and a monopolar needle electrode (no. 9013R0312, diameter 0.3 mm; Medtronic) was inserted into the tail of the mouse to earth the system. Electrical activity was monitored in both *gastrocnemius* and *tibialis anterior* on both legs for at least 2 minutes. Spontaneous activity was differentiated from voluntary activity by visual and auditory inspection. Only spontaneous activity with peak-to-peak amplitude of at least 50  $\mu$ V was considered to be significant.

### Tissues preparation

For biochemistry, mice were killed by decapitation and tissues were carefully dissected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

### RNA extraction and RT-real-time PCR

Total RNA was prepared following standard protocols. Briefly, each frozen sample was placed into a tube containing a 5-mm stainless steel bead. Working on ice, 1 ml Trizol reagent (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) was added, and homogenization was performed twice in a TissueLyser (Qiagen) at 30 Hz for 3 minutes. RNA was extracted with chloroform/isopropyl alcohol/ethanol technic and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA using Iscript reverse transcriptase (iscript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, Bio-Rad) as specified by the manufacturer. Gene expression was measured using the SYBR green reagent (SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad) following the manufacturer's instructions on a Bio-Rad iCycler. PCR was performed in optimized conditions: 95°C denatured for 30 seconds, followed by 40 cycles of 4 seconds at 95°C and 4 seconds at 60°C. Primer sequences are given in [Supplementary Material, Table S1](#). Standardization was performed using three standard genes: 18S (18S Ribosomal RNA), Pol2 (DNA-dependent RNA polymerase II) and *Tbp* (TATA-box binding protein) to compute a normalization factor using Genorm software v3.5.

### Western blot analysis

Whole tissue protein extraction was performed as follows. Snap frozen muscle tissue was pulverized in a TissueLyser (Qiagen) 2 × 20 seconds using stainless steel beads. Tissue powder was homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton 100X, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate) 1 ml/100 mg tissue containing 1/100 protease inhibitor cocktail (Calbiochem), phosphatase inhibitor cocktail 2 and 3 (Sigma Aldrich). Protein quantification was performed using a BCA Assay Reagent Kit (UP95424 Uptima). Equal amounts of soluble proteins were denatured by boiling, resolved by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membrane (Bio-Rad) using a semi-dry Transblot Turbo transfer system (Bio-Rad). After using 10% fat-

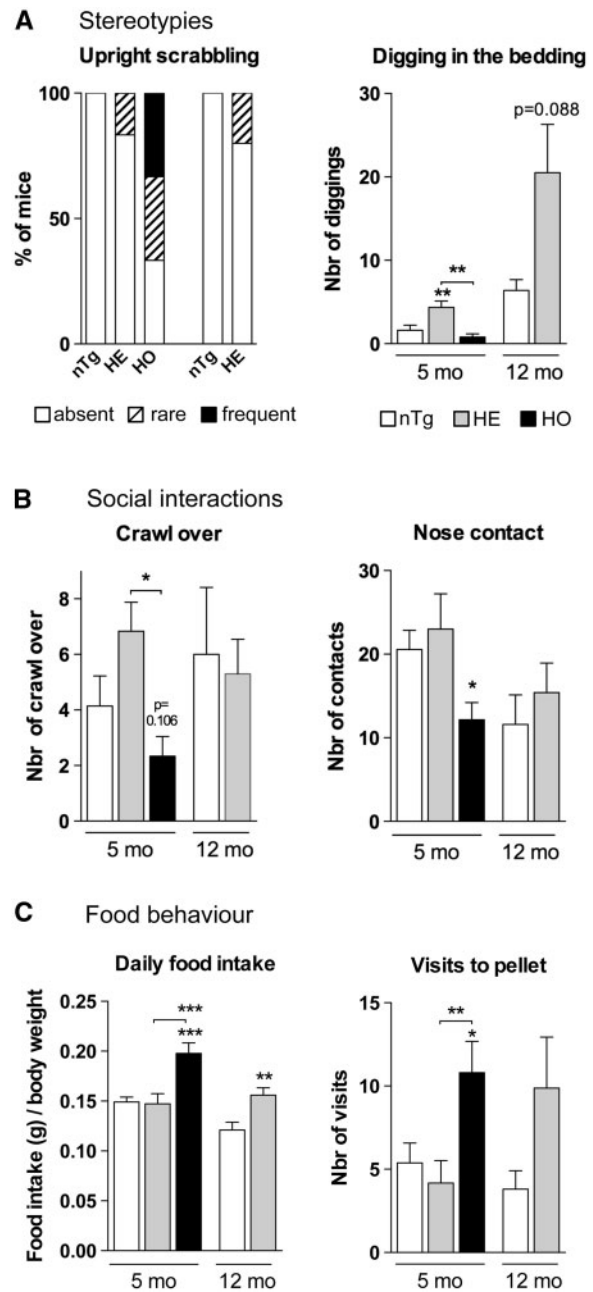


Figure 14. CHMP2B<sup>intron5</sup> Tg mice show behaviour modifications in the homecage. (A and B) Evaluation of stereotypies (A) and social interactions (B) at 5 and 12 months of age in the homecage. Upright scrabbling is increased in HO and HE mice while digging in the bedding is only increased in HE mice compared to nTg littermates. Crawl over and nose contact are decreased in HO mice when compared to nTg littermates. (C) Evaluation of food-related behaviour at 5 months of age. The daily food intake (left) and the number of visits to food pellet over a 15 minutes period (right) are increased in HO mice compared to HE and nTg mice. Values represent the mean  $\pm$  SEM,  $n=8-12$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$  one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD or Student's *t* test.

free milk in PBS as blocker, membranes were probed with primary antibodies against HA (Cell Signalling, #3724s, 1/250) and CHMP2B (Abcam, #AB33174, 1/1000), detected with HRP-coupled secondary antibodies (P.A.R.I.S, anti-rabbit HRP # BI2407, anti-mouse HRP # BI2413C, 1/5000). The protein bands were detected by chemiluminescence using an ECL Lumina Forte (Millipore) and a chemiluminescence detector (Chemidoc, Bio-Rad).

## Histology

Mice were deeply anesthetized with 120 mg/kg ketamine, 16 mg/kg xylazine injected intraperitoneally and perfused with 4% ice-cold paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. Tissues were post-fixed in the same fixative for 24 hours and kept at 4 °C in PBS containing 0.002% thimerosal until use.

Forty- $\mu$ m-thick sections of brain and spinal cord were performed using a Leica VT1000S vibratome. The following antibodies were used anti-Choline Acetyl Transferase (CHAT, Chemicon, #ab144P, 1/100), anti-FUS (Bethyl, #A303-839A, 1/200), anti-GFAP (Cell Signalling, #36705, 1/200), anti-HA (Cell Signalling, #3724s, 1/100), anti-IBA1 (Abcam, #ab5076, 1/100), anti-NEU N (Millipore, #ABN78, 1/100), anti-p62 (Abcam, #AB56416, 1/100), anti-TDP43 (Proteintech, #107822AP, 1/100) and anti-ubiquitin (Chemicon, #MAB1510, 1/200). For immunoperoxidase staining, free floating sections were pre-treated 10 minutes in PBS-3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> followed by 30 minutes in PBS containing 1% triton-X100 and 5% donkey serum, and 30 minutes at 80 °C in 10 mM citrate buffer pH 6. Selected primary antibodies were incubated overnight at room temperature at the indicated concentration in PBS containing 0.1% triton-X100 (PBT). After three washes with PBT, sections were incubated 1 hour at room temperature with the appropriate biotinylated secondary antibody (biotinylated donkey anti-mouse IgG or biotinylated donkey anti-rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch) followed by three washes with PBT and 1-hour incubation with the ABC complex according to manufacturer's instructions (Vector Laboratories). Revelation was performed using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories). For fluorescent double immunolabelling, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre-treatment was omitted and the secondary antibodies used were coupled with either Alexa 488, Cyanin 3, Alexa 594 or Alexa 647 (Jackson immunoresearch). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (1  $\mu$ g/ml; Sigma) or DraQ5<sup>TM</sup> (1  $\mu$ g/ml; Cell Signalling). Autofluorescence was quenched with Sudan black B treatment before mounting (75).

To study the NMJ morphology, bundles of muscle fibres were prepared from the *tibialis anterior* muscle under a binocular microscope, and labelled with antibodies directed against synaptophysin (Millipore, #MAB5258, 1/100) and neurofilament 200 (Sigma, #N1442, 1/200), and rhodamine-conjugated alpha-bungarotoxin ( $\alpha$ BGT, 1  $\mu$ g/ml; Sigma) and Hoechst 33342 (1  $\mu$ g/ml; Sigma) or DraQ5<sup>TM</sup> (1  $\mu$ g/ml; Cell Signalling) using a standard protocol. Usually, five to six bundles were examined per animal, which represented 30–60 analyzed NMJs per animal.

Immunofluorescence stainings were monitored with a laser scanning microscope (Leica TCS SP5 II, LEICA Microsystems). Five frames for cortex or eight frames for spinal cord (steps size 0.5  $\mu$ m) were acquired with a 20 $\times$  lens PL APO Dry UV (NA 0.7) and merged to get a maximum projection of 2.5- $\mu$ m-size depth for cortex or 3.5  $\mu$ m size depth for spinal cord. For inclusions or NMJ analyses, frames (0.6  $\mu$ m thick) were obtained with a 63 $\times$  lens PL APO lambda blue (NA 1.4). Hoechst 33342 was excited using diode 405 nm, Alexa 488 by the 488 nm ray of the argon laser, Cyanin 3, TRITC or Alexa 594 by diode 561, Alexa 647 or DraQ5 by 633 nm Helium-Neon laser. Emission bandwidths used sequentially were 410–470 nm for Hoechst 33342, 520–550 nm for Alexa 488, 570–620 nm for Cyanin3, TRITC or Alexa 594 and 650–690 nm for Alexa 647 or DraQ5<sup>TM</sup>.

Sciatic nerves were stained by 1% osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in Araldite-Epon mixture. Semi-thin sections (1.5  $\mu$ m thick) were performed using a Leica RM2265 microtome. The area of myelinated axons was measured using the LuciaG software. Between 90% and 95% of the fibres present in the section were analyzed for each sciatic nerve.

MN were counted in the ventral horns of the lumbar spinal cord segments L3–L5, using at least seven non-adjacent cryosections of 14  $\mu$ m thick per animal examined with a Nikon microscope at a 200 $\times$  magnification (51). MNs were identified by immunostaining with an antibody directed against CHAT as described above. Counts of CHAT positive MNs were performed by an independent genotype-blinded observer.

Pictures used for counting were taken with a Nikon Eclipse E800 microscope, a Nikon digital sight DS-U3 camera and the NIS Element software.

## Statistical analysis

Unless otherwise indicated, data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. GraphPad Prism version 6.0a software was used for statistical analysis. Tests used are indicated in the legends under the figures. Differences with P-values of at least <0.05 were considered significant. For Kaplan-Meier survival analysis, a log rank test was used to determine significance.

## Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

## Acknowledgements

Authors thank Annie Picchinenna and Marie José Ruivo for excellent technical assistance. We thank the “plate-forme d'imagerie in vitro” from UPS 3156 CNRS for facilities with confocal imaging. We thank Dr Nadège Krebs from Noldus Technology for her helpful assistance and discussions.

Conflict of Interest statement. None declared.

## Funding

Association pour la Recherche et le Développement de Moyens de lutte contre les Maladies Neurodégénératives (J.P.L.) European Community's Health Seventh Framework Program (Euro-MOTOR) [259867]. Region Alsace and INSERM (to A.V). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## References

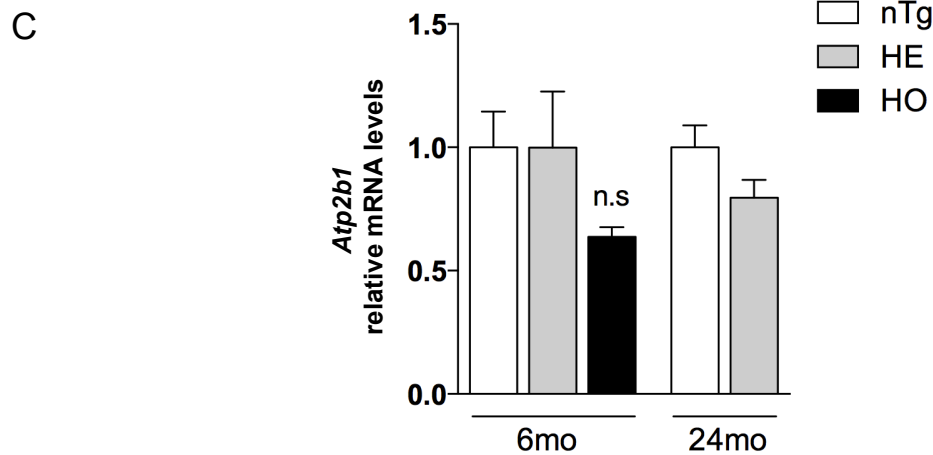
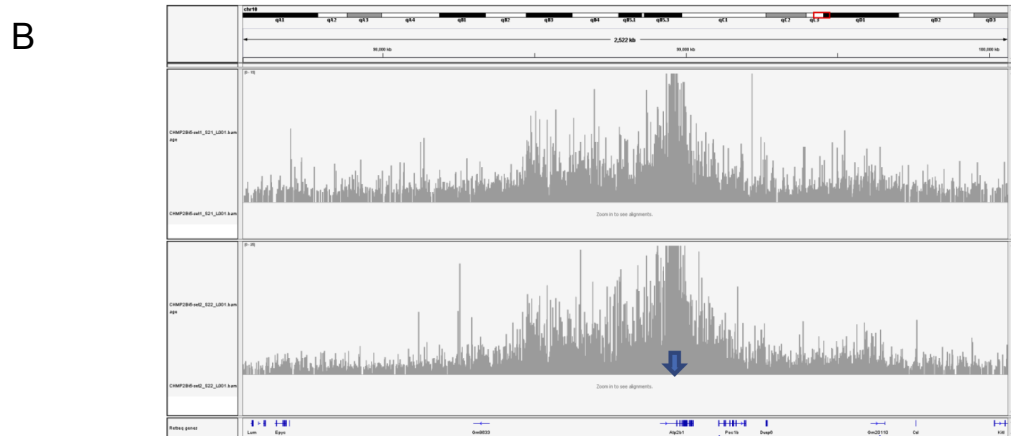
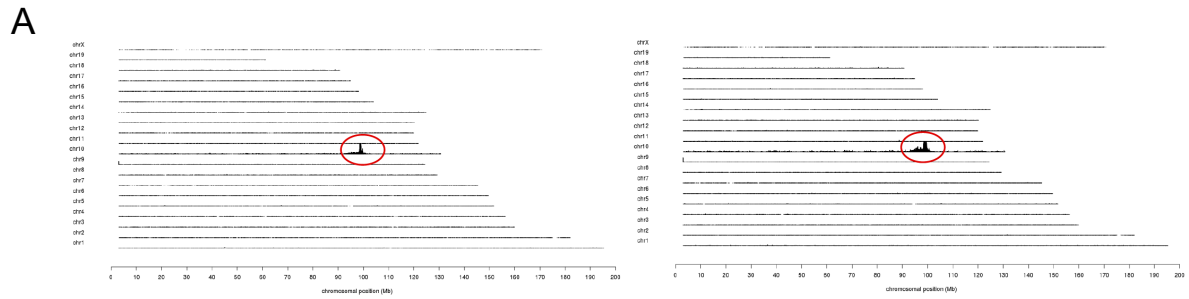
- Ling, S.C., Polymenidou, M. and Cleveland, D.W. (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, **79**, 416–438.
- Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K. and Hodges, J.R. (2002) The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*, **58**, 1615–1621.
- Strong, M.J., Lomen-Hoerth, C., Caselli, R.J., Bigio, E.H. and Yang, W. (2003) Cognitive impairment, frontotemporal dementia, and the motor neuron diseases. *Ann. Neurol.*, **54** Suppl 5, S20–S23.
- Lannuzel, A., Mecharles, S., Tressieres, B., Demoly, A., Alhendi, R., Hedreville-Tablon, M.A. and Alecu, C. (2015) Clinical varieties and epidemiological aspects of amyotrophic lateral sclerosis in the Caribbean island of Guadeloupe: a new focus of ALS associated with Parkinsonism. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **16**, 216–223.
- Fecto, F. and Siddique, T. (2012) What is repeated in ALS and FTLD. *Lancet Neurol.*, **11**, 25–27.

6. Strong, M. and Rosenfeld, J. (2003) Amyotrophic lateral sclerosis: a review of current concepts. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, **4**, 136–143.
7. Murphy, J.M., Henry, R.G., Langmore, S., Kramer, J.H., Miller, B.L. and Lomen-Hoerth, C. (2007) Continuum of frontal lobe impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.*, **64**, 530–534.
8. Phukan, J., Elamin, M., Bede, P., Jordan, N., Gallagher, L., Byrne, S., Lynch, C., Pender, N. and Hardiman, O. (2011) The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **83**, 102–108.
9. Bak, T.H. and Hodges, J.R. (2001) Motor neurone disease, dementia and aphasia: coincidence, co-occurrence or continuum? *J. Neurol.*, **248**, 260–270.
10. Lomen-Hoerth, C., Anderson, T. and Miller, B. (2002) The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology*, **59**, 1077–1079.
11. Parkinson, N., Ince, P.G., Smith, M.O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P.M., Morrison, K.E., Pall, H.S., Hardiman, O., Collinge, J., et al. (2006) ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology*, **67**, 1074–1077.
12. Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., et al. (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, **319**, 1668–1672.
13. Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., et al. (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, **323**, 1208–1211.
14. Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., et al. (2010) Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*, **68**, 857–864.
15. DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, **72**, 245–256.
16. Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., et al. (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, **72**, 257–268.
17. Lee, J.A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G. and Gao, F.B. (2007) ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol.*, **17**, 1561–1567.
18. Urwin, H., Authier, A., Nielsen, J.E., Metcalf, D., Powell, C., Froud, K., Malcolm, D.S., Holm, I., Johannsen, P., Brown, J., et al. (2010) Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 2228–2238.
19. Ghazi-Noori, S., Froud, K.E., Mizielinska, S., Powell, C., Smidak, M., Fernandez de Marco, M., O'Malley, C., Farmer, M., Parkinson, N., Fisher, E.M., et al. (2012) Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain*, **135**, 819–832.
20. Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Bouron, A., Sadoul, R. and Goldberg, Y. (2010) CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J. Cell Sci.*, **123**, 2943–2954.
21. Chassefeyre, R., Martinez-Hernandez, J., Bertaso, F., Bouquier, N., Blot, B., Laporte, M., Fraboulet, S., Coute, Y., Devoy, A., Isaacs, A.M., et al. (2015) Regulation of postsynaptic function by the dementia-related ESCRT-III subunit CHMP2B. *J. Neurosci.*, **35**, 3155–3173.
22. Skibinski, G., Parkinson, N.J., Brown, J.M., Chakrabarti, L., Lloyd, S.L., Hummerich, H., Nielsen, J.E., Hodges, J.R., Spillantini, M.G., Thusgaard, T., et al. (2005) Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat. Genet.*, **37**, 806–808.
23. Cox, L.E., Ferraiuolo, L., Goodall, E.F., Heath, P.R., Higginbottom, A., Mortiboys, H., Hollinger, H.C., Hartley, J.A., Brockington, A., Burness, C.E., et al. (2010) Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One*, **5**, e9872.
24. van Blitterswijk, M., Vlam, L., van Es, M.A., van der Pol, W.L., Hennekam, E.A., Dooijes, D., Schelhaas, H.J., van der Kooij, A.J., de Visser, M., Veldink, J.H., et al. (2012) Genetic overlap between apparently sporadic motor neuron diseases. *PLoS One*, **7**, e48983.
25. Rizzu, P., van Mil, S.E., Anar, B., Rosso, S.M., Donker Kaat, L., Heutink, P. and van Swieten, J.C. (2006) CHMP2B mutations are not a cause of dementia in Dutch patients with familial and sporadic frontotemporal dementia. *Am. J. Med. Genet. B*, **141B**, 944–946.
26. van der Zee, J., Urwin, H., Engelborghs, S., Bruyland, M., Vandenberghe, R., Dermaut, B., De Pooter, T., Peeters, K., Santens, P., De Deyn, P.P., et al. (2008) CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 313–322.
27. Ghanim, M., Guillot-Noel, L., Pasquier, F., Jornea, L., Deramecourt, V., Dubois, B., Le Ber, I. and Brice, A. (2010) CHMP2B mutations are rare in French families with frontotemporal lobar degeneration. *J. Neurol.*, **257**, 2032–2036.
28. Gordon, J.W., Chesa, P.G., Nishimura, H., Rettig, W.J., Maccari, J.E., Endo, T., Seravalli, E., Seki, T. and Silver, J. (1987) Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. *Cell*, **50**, 445–452.
29. Clayton, E.L., Mizielinska, S., Edgar, J.R., Nielsen, T.T., Marshall, S., Norona, F.E., Robbins, M., Damirji, H., Holm, I.E., Johannsen, P., et al. (2015) Frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutation is characterised by neuronal lysosomal storage pathology. *Acta Neuropathol.*, **130**, 511–523.
30. Gascon, E., Lynch, K., Ruan, H., Almeida, S., Verheyden, J.M., Seeley, W.W., Dickson, D.W., Petrucelli, L., Sun, D., Jiao, J., et al. (2014) Alterations in microRNA-124 and AMPA receptors contribute to social behavioral deficits in frontotemporal dementia. *Nat. Med.*, **20**, 1444–1451.
31. Caroni, P. (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J. Neurosci. Methods*, **71**, 3–9.
32. Fecto, F., Esengul, Y.T. and Siddique, T. (2014) Protein recycling pathways in neurodegenerative diseases. *Alzheimers Res. Ther.*, **6**, 13.
33. Al-Chalabi, A., Jones, A., Troakes, C., King, A., Al-Sarraj, S. and van den Berg, L.H. (2012) The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.*, **124**, 339–352.
34. Ng, A.S., Rademakers, R. and Miller, B.L. (2015) Frontotemporal dementia: a bridge between dementia and neuromuscular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1338**, 71–93.
35. Bjornskov, E.K., Norris, F.H. Jr. and Mower-Kuby, J. (1984) Quantitative axon terminal and end-plate morphology in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.*, **41**, 527–530.



36. Eftimie, R., Brenner, H.R. and Buonanno, A. (1991) Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 1349–1353.
37. Duclert, A. and Changeux, J.P. (1995) Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiol. Rev.*, **75**, 339–368.
38. Vernay, A.S.F. and René, F., (2016) Evaluating behavior in mouse models of behavioral variant of frontotemporal dementia: which test for which symptom? *Neurodegener. Dis.*, **16**, 127–139.
39. Okunade, G.W., Miller, M.L., Pyne, G.J., Sutliff, R.L., O'Connor, K.T., Neumann, J.C., Andringa, A., Miller, D.A., Prasad, V., Doetschman, T., et al. (2004) Targeted ablation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J. Biol. Chem.*, **279**, 33742–33750.
40. Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N.J., Miller, T.M. and Baloh, R.H. (2009) TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 18809–18814.
41. Tsai, K.J., Yang, C.H., Fang, Y.H., Cho, K.H., Chien, W.L., Wang, W.T., Wu, T.W., Lin, C.P., Fu, W.M. and Shen, C.K. (2010) Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D. *J. Exp. Med.*, **207**, 1661–1673.
42. Mitchell, J.C., McGoldrick, P., Vance, C., Hortobagyi, T., Sreedharan, J., Rogelj, B., Tudor, E.L., Smith, B.N., Klasen, C., Miller, C.C., et al. (2013) Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol.*, **125**, 273–288.
43. Schroeter, M.L., Raczka, K., Neumann, J. and Yves von Cramon, D. (2007) Towards a nosology for frontotemporal lobar degenerations—a meta-analysis involving 267 subjects. *Neuroimage*, **36**, 497–510.
44. Holm, I.E., Englund, E., Mackenzie, I.R., Johannsen, P. and Isaacs, A.M. (2007) A reassessment of the neuropathology of frontotemporal dementia linked to chromosome 3. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **66**, 884–891.
45. Holm, I.E., Isaacs, A.M. and Mackenzie, I.R. (2009) Absence of FUS-immunoreactive pathology in frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3) caused by mutation in the CHMP2B gene. *Acta Neuropathol.*, **118**, 719–720.
46. Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P. and Migheli, A. (1996) Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, **139 Suppl**, 27–33.
47. Murayama, S., Inoue, K., Kawakami, H., Bouldin, T.W. and Suzuki, K. (1991) A unique pattern of astrocytosis in the primary motor area in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.*, **82**, 456–461.
48. Niizato, K., Tsuchiya, K., Tominaga, I., Kato, Y. and Ikeda, K. (1997) Pick's disease with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): report of two autopsy cases and literature review. *J. Neurol. Sci.*, **148**, 107–112.
49. Gydesen, S., Brown, J.M., Brun, A., Chakrabarti, L., Gade, A., Johannsen, P., Rossor, M., Thusgaard, T., Grove, A., Yancopoulos, D., et al. (2002) Chromosome 3 linked frontotemporal dementia (FTD-3). *Neurology*, **59**, 1585–1594.
50. Isaacs, A.M., Johannsen, P., Holm, I. and Nielsen, J.E. (2011) Frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutations. *Curr. Alzheimer Res.*, **8**, 246–251.
51. Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.L. and Loeffler, J.P. (2004) Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 11159–11164.
52. Dupuis, L., Pradat, P.F., Ludolph, A.C. and Loeffler, J.P. (2011) Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.*, **10**, 75–82.
53. Ahmed, R.M., Irish, M., Piguat, O., Halliday, G.M., Farooqi, S., Hodges, J.R. and Kiernan, M.C. (2016) Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: distinct and overlapping changes in eating behaviour and metabolism. *Lancet Neurol.*, **15**, 332–342.
54. Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A. and Glass, J.D. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.*, **185**, 232–240.
55. Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W. and Milligan, C. (2013) Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav.*, **3**, 431–457.
56. Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W. and Milligan, C. (2013) Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav.*, **3**, 335–350.
57. Rocha, M.C., Pousinha, P.A., Correia, A.M., Sebastiao, A.M. and Ribeiro, J.A. (2013) Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS One*, **8**, e73846.
58. Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Menger, Y., Boutillier, A.L. and Loeffler, J.P. (2007) Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J. Neurosci.*, **27**, 5535–5545.
59. Gould, T.W., Buss, R.R., Vinsant, S., Prevette, D., Sun, W., Knudson, C.M., Milligan, C.E. and Oppenheim, R.W. (2006) Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J. Neurosci.*, **26**, 8774–8786.
60. Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E.D., De Zeeuw, C.I. and Hoogenraad, C.C. (2008) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *J. Neurosci.*, **28**, 2075–2088.
61. Lino, M.M., Schneider, C. and Caroni, P. (2002) Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J. Neurosci.*, **22**, 4825–4832.
62. Pramatarova, A., Laganier, J., Roussel, J., Brisebois, K. and Rouleau, G.A. (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J. Neurosci.*, **21**, 3369–3374.
63. Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, **264**, 1772–1775.

64. Morrison, B.M., Janssen, W.G., Gordon, J.W. and Morrison, J.H. (1998) Time course of neuropathology in the spinal cord of G86R superoxide dismutase transgenic mice. *J. Comp. Neurol.*, **391**, 64–77.
65. Bilsland, L.G., Sahai, E., Kelly, G., Golding, M., Greensmith, L. and Schiavo, G. (2010) Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 20523–20528.
66. De Vos, K.J., Chapman, A.L., Tennant, M.E., Manser, C., Tudor, E.L., Lau, K.F., Brownlees, J., Ackerley, S., Shaw, P.J., McLoughlin, D.M., et al. (2007) Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 2720–2728.
67. Gonzalez de Aguilar, J.L., Echaniz-Laguna, A., Fergani, A., Rene, F., Meininger, V., Loeffler, J.P. and Dupuis, L. (2007) Amyotrophic lateral sclerosis: all roads lead to Rome. *J. Neurochem.*, **101**, 1153–1160.
68. Joshi, M., Keith Pittman, H., Haisch, C. and Verbanac, K. (2008) Real-time PCR to determine transgene copy number and to quantitate the biolocalization of adoptively transferred cells from EGFP-transgenic mice. *Biotechniques*, **45**, 247–258.
69. de Vree, P.J., de Wit, E., Yilmaz, M., van de Heijning, M., Klous, P., Verstegen, M.J., Wan, Y., Teunissen, H., Krijger, P.H., Geeven, G., et al. (2014) Targeted sequencing by proximity ligation for comprehensive variant detection and local haplotyping. *Nat. Biotechnol.*, **32**, 1019–1025.
70. Rogers, D.C., Fisher, E.M., Brown, S.D., Peters, J., Hunter, A.J. and Martin, J.E. (1997) Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm. Genome*, **8**, 711–713.
71. Ryan, B.C., Young, N.B., Crawley, J.N., Bodfish, J.W. and Moy, S.S. (2010) Social deficits, stereotypy and early emergence of repetitive behavior in the C58/J inbred mouse strain. *Behav. Brain Res.*, **208**, 178–188.
72. Defensor, E.B., Pearson, B.L., Pobbe, R.L., Bolivar, V.J., Blanchard, D.C. and Blanchard, R.J. (2011) A novel social proximity test suggests patterns of social avoidance and gaze aversion-like behavior in BTBR T+ tf/J mice. *Behav. Brain Res.*, **217**, 302–308.
73. Echaniz-Laguna, A., Rene, F., Marcel, C., Bangratz, M., Fontaine, B., Loeffler, J.P. and Nicole, S. (2009) Electrophysiological studies in a mouse model of Schwartz-Jampel syndrome demonstrate muscle fiber hyperactivity of peripheral nerve origin. *Muscle Nerve*, **40**, 55–61.
74. Dupuis, L., Fergani, A., Braunstein, K.E., Eschbach, J., Holl, N., Rene, F., Gonzalez De Aguilar, J.L., Zoerner, B., Schwalenstocker, B., Ludolph, A.C., et al. (2009) Mice with a mutation in the dynein heavy chain 1 gene display sensory neuropathy but lack motor neuron disease. *Exp. Neurol.*, **215**, 146–152.
75. Oliveira, V.C., Carrara, R.C., Simoes, D.L., Saggioro, F.P., Carlotti, C.G., Jr., Covas, D.T. and Neder, L. (2010) Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histol. Histopathol.*, **25**, 1017–1024.



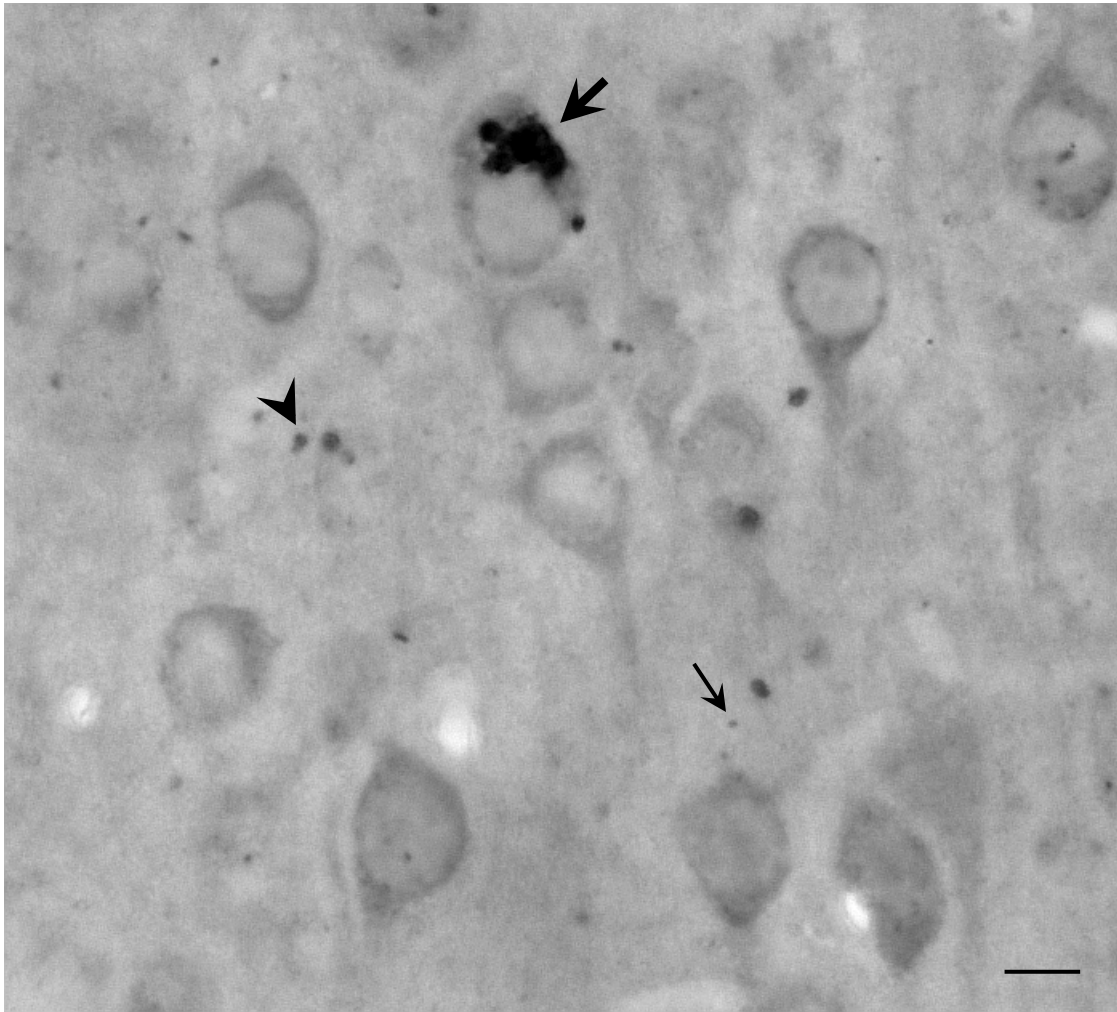
**Supplemental figure 1: Determination of the transgene integration site.**

A: TLA sequence coverage across the mouse genome. Data shown in left panel was generated using primer set 1 and right panel using primer set 2. The different chromosomes are indicated on the y-axis, the chromosomal position on the x-axis. Encircled in red is the integration site in chromosome 10. Highest coverage peak was observed at chromosome 10. No additional peaks were observed across the genome indicating a single integration event.

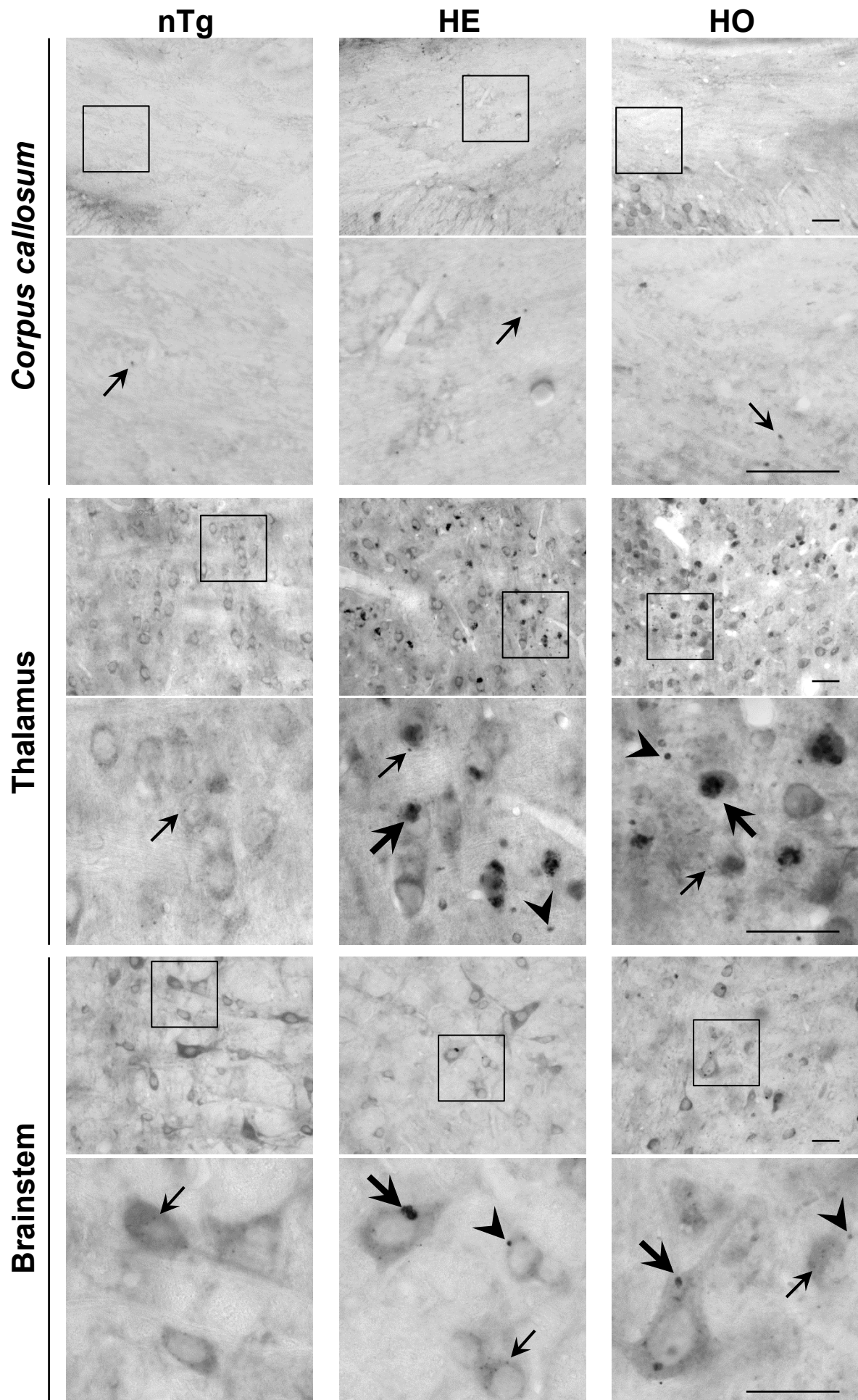
B: IGV screenshot showing the sequence coverage across the transgene integration site. Coverage generated across chr10:97,538,178-100,063,099 using primer set 1 (top panel) and set 2 (bottom panel) are depicted. Blue arrow indicates the integration site at the *Atp2b1* gene.

C: Expression of *Atp2b1* is not altered by the integration of the transgene. Relative mRNA levels of *Atp2b1* were measured by RT-qPCR in the cortex of nTg, HE and HO mice at 6 and 24 months of age. Graphs represent mean fold change  $\pm$  SEM from age-matched nTg n=5-8. One-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD (6 mo) or student's t test (ES).

HE: hemizygous, HO: homozygous, nTg: non transgenic.

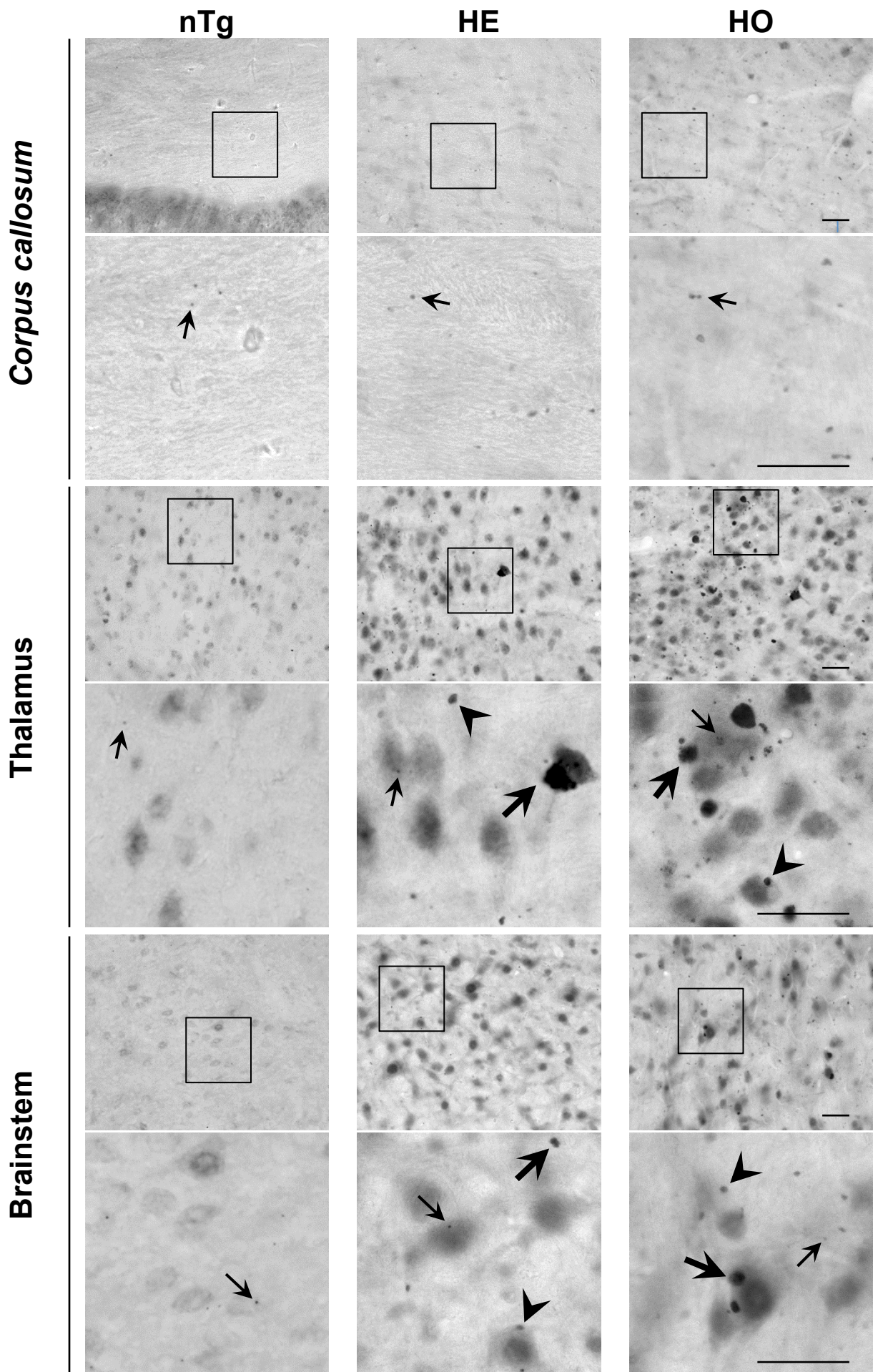


**Supplemental figure 2:** Representative picture showing p62 inclusions of the different sizes found in CHMP2B<sup>intron5</sup> cortical neurons of 6 month-old HO mouse. Small arrow: small size inclusion ( $\leq 1\mu\text{m}$ ), arrowhead: medium size inclusion (1.5-3.5 $\mu\text{m}$ ), large arrow: large size inclusion  $>3.5\mu\text{m}$ . Scale bar: 5 $\mu\text{m}$ .

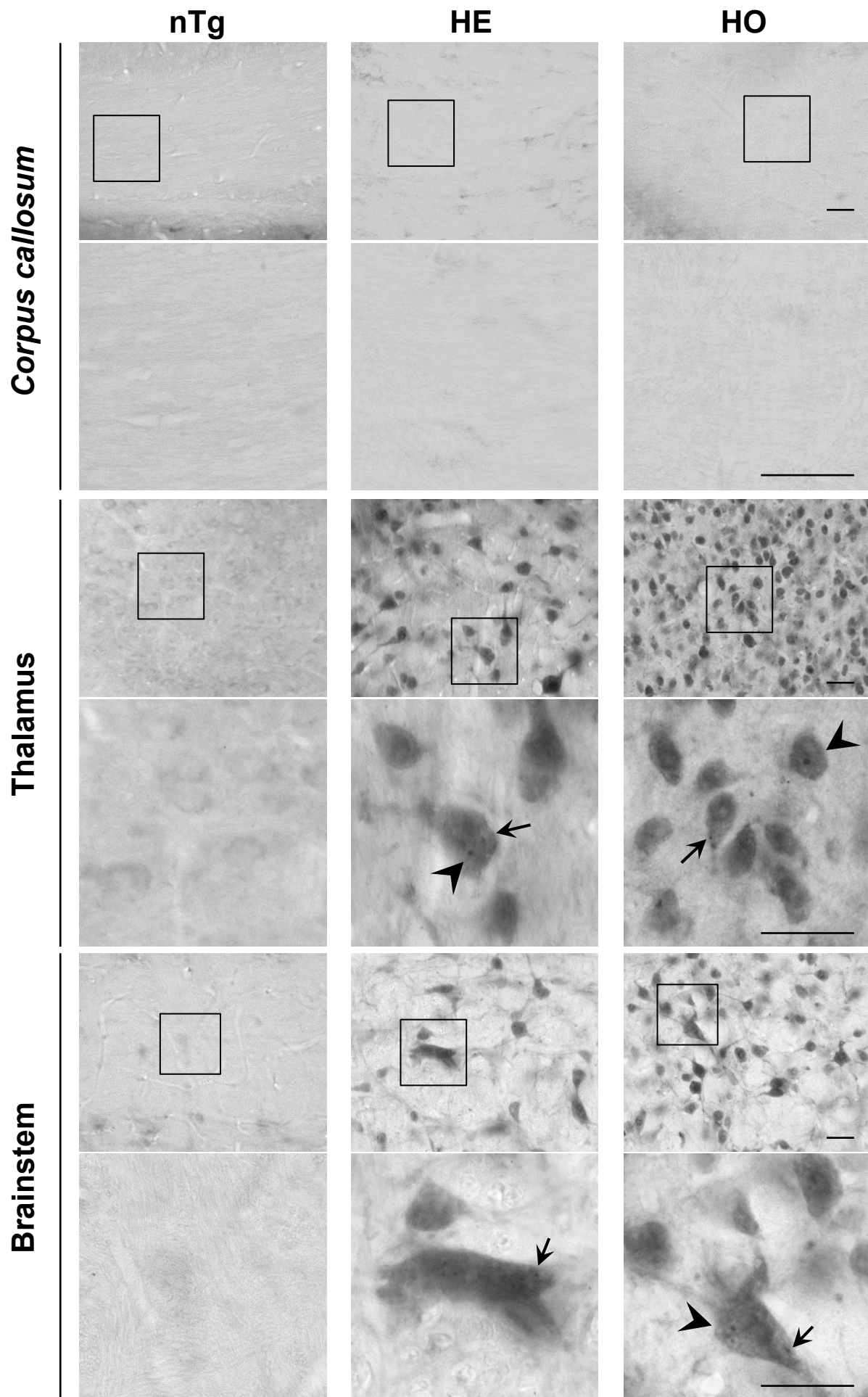


**Supplemental figure 3: p62 inclusions in the *corpus callosum*, thalamus and brainstem of 6 month-old mice.** High magnification of inset is located below each picture. nTg: non transgenic, HE: hemizygous, HO: homozygous. Small arrow: small size inclusion ( $\leq 1\mu\text{m}$ ), arrowhead: medium size inclusion ( $1.5\text{-}3.5\mu\text{m}$ ), large arrow: large size inclusion ( $>3.5\mu\text{m}$ ). Scale bar:  $25\mu\text{m}$ .



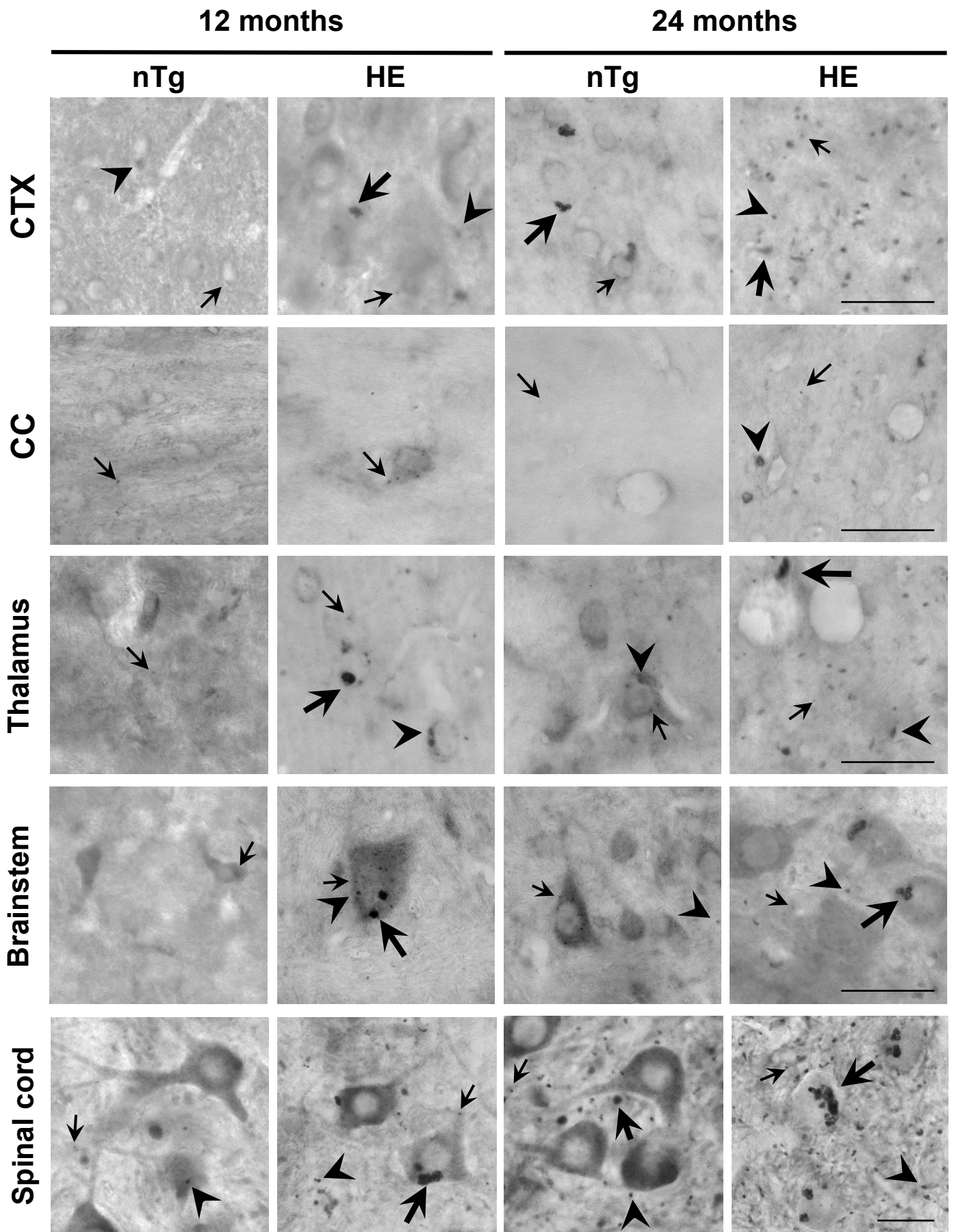


**Supplemental figure 4: Ubiquitin inclusions in the *corpus callosum*, thalamus and brainstem of 6 month-old mice.** High magnification of inset is located below each picture. nTg: non transgenic, HE: hemizygous, HO: homozygous. Small arrow: small size inclusion ( $\leq 1\mu\text{m}$ ), arrowhead: medium size inclusion ( $1.5\text{-}3.5\mu\text{m}$ ), large arrow: large size inclusion  $>3.5\mu\text{m}$ . Scale bar:  $25\mu\text{m}$ .

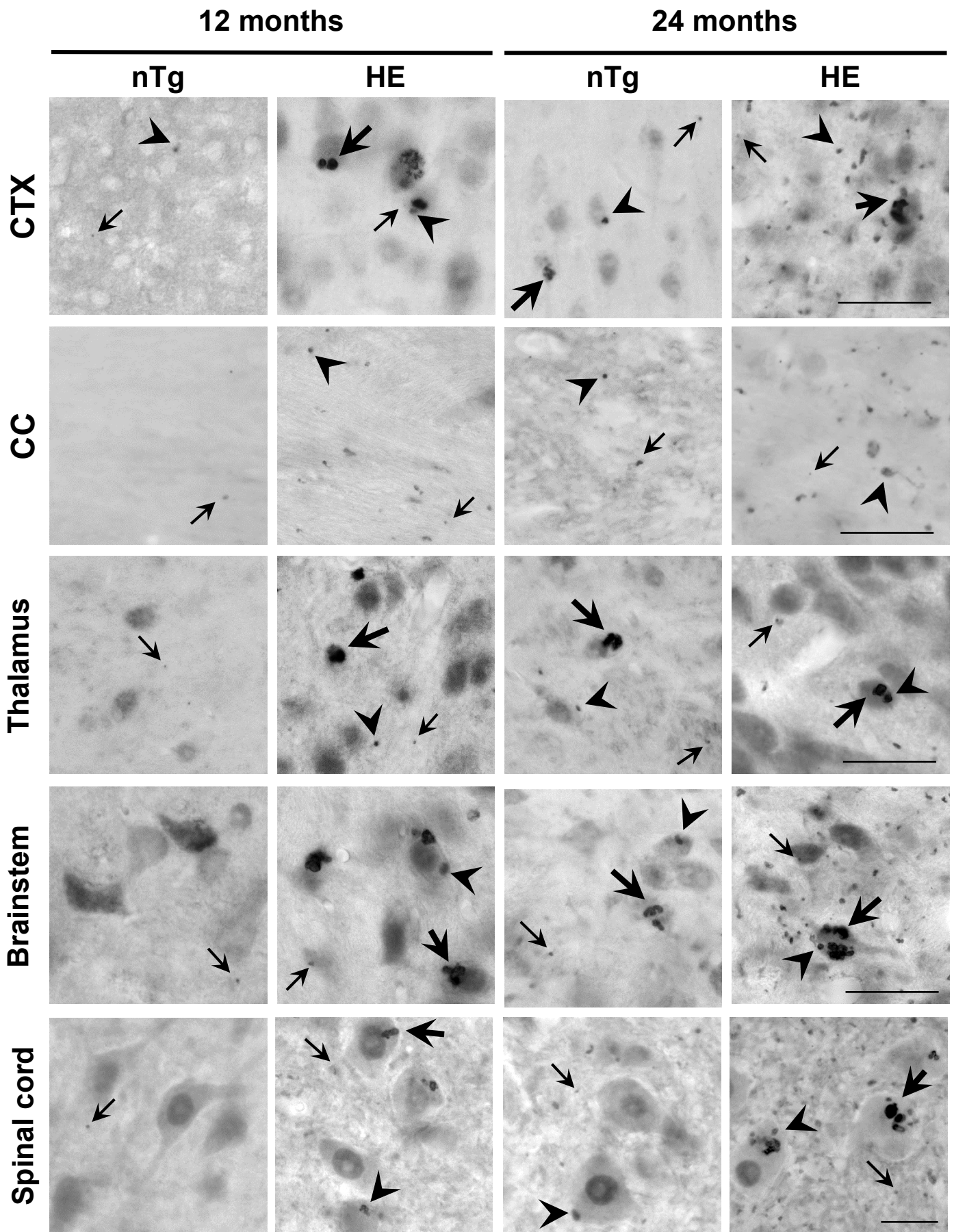


**Supplemental figure 5: HA inclusions in the *corpus callosum*, thalamus and brainstem of 6 month-old mice.** High magnifications of insets are located below each picture. nTg: non transgenic, HE: hemizygous, HO: homozygous. Small arrow: small size inclusion ( $\leq 1\mu\text{m}$ ), arrowhead: medium size inclusion ( $1.5\text{-}3.5\mu\text{m}$ ). Scale bar:  $25\mu\text{m}$ .



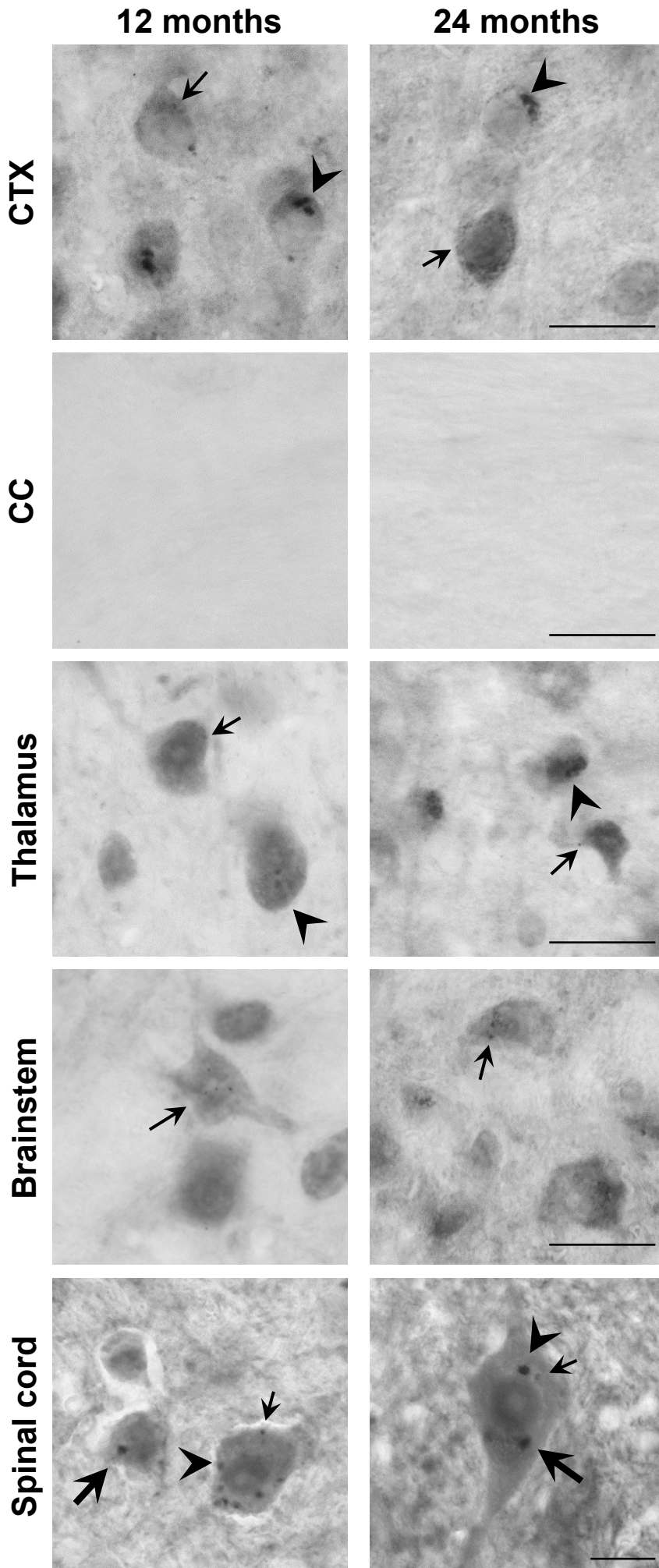


**Supplemental figure 6: p62 inclusions in the brain and spinal cord of 12 and 24 month-old mice.** p62 inclusions were identified in several brain regions including cortex (CTX), thalamus, brainstem and spinal cord. CC: *corpus callosum*, nTg: non transgenic, HE: hemizygous, HO: homozygous. Small arrow: small size inclusion ( $\leq 1\mu\text{m}$ ), arrowhead: medium size inclusion ( $1.5\text{-}3.5\mu\text{m}$ ), large arrow: large size inclusion  $>3.5\mu\text{m}$ . Scale bar:  $25\mu\text{m}$ .



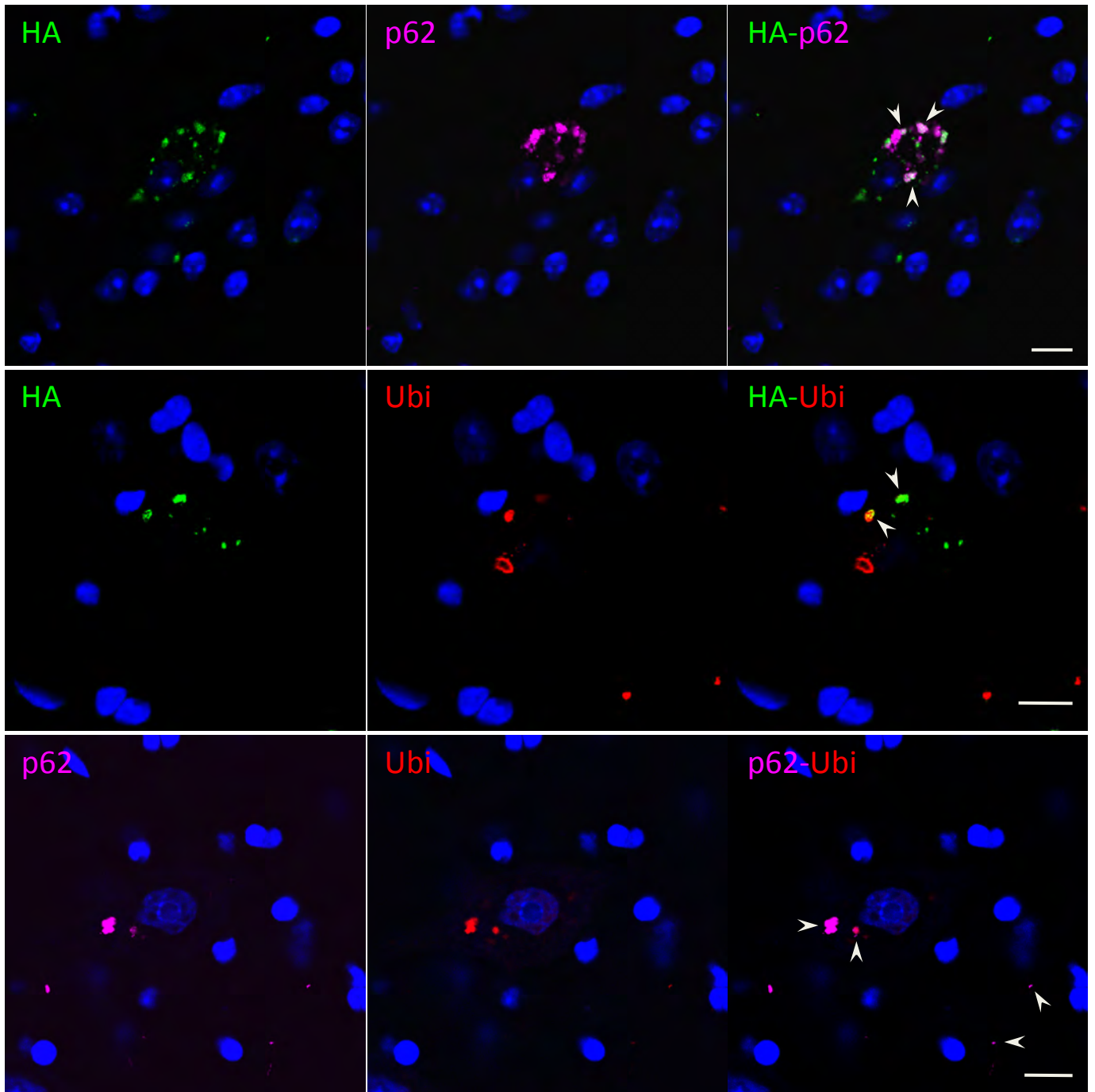
**Supplemental figure 7: Ubiquitin inclusions in the brain and spinal cord of 12 and 24 month-old mice.** Ubiquitin inclusions were identified in several brain regions including cortex (CTX), *corpus callosum* (CC), thalamus, brainstem and spinal cord. nTg: non transgenic, HE: hemizygous, HO: homozygous. Small arrow: small size inclusion ( $\leq 1\mu\text{m}$ ), arrowhead: medium size inclusion ( $1.5\text{-}3.5\mu\text{m}$ ), large arrow: large size inclusion  $>3.5\mu\text{m}$ . Scale bar:  $25\mu\text{m}$ .





**Supplemental figure 8: HA inclusions in the brain and spinal cord of 12 and 24 month-old mice.** HA inclusions were identified in several brain regions including cortex (CTX), thalamus, brainstem and spinal cord.

CC: *corpus callosum*, HE: hemizygous, HO: homozygous. Small arrow: small size inclusion ( $\leq 1\mu\text{m}$ ), arrowhead: medium size inclusion (1.5-3.5 $\mu\text{m}$ ), large arrow: large size inclusion  $> 3.5\mu\text{m}$ . Scale bar: 25 $\mu\text{m}$ .

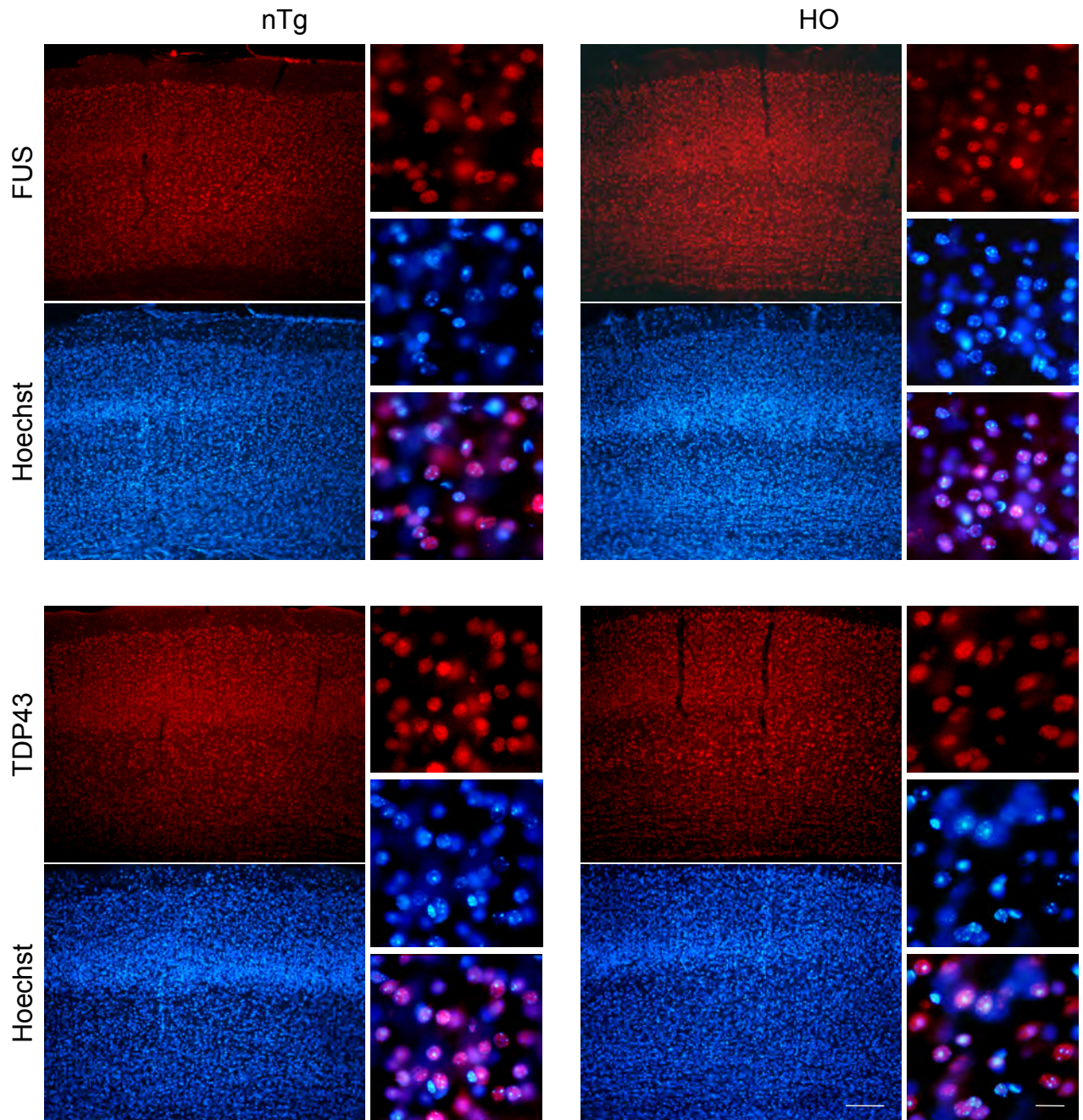


**Supplemental figure 9: HO motor neurons contain cytoplasmic inclusions positive for HA and p62 or ubiquitin.**

Double immunolabelling HA (green)-p62 (magenta) (Top), HA (green)-Ubiquitin (Ubi, red) (middle) and p62 (magenta)-Ubi (red) (Bottom)

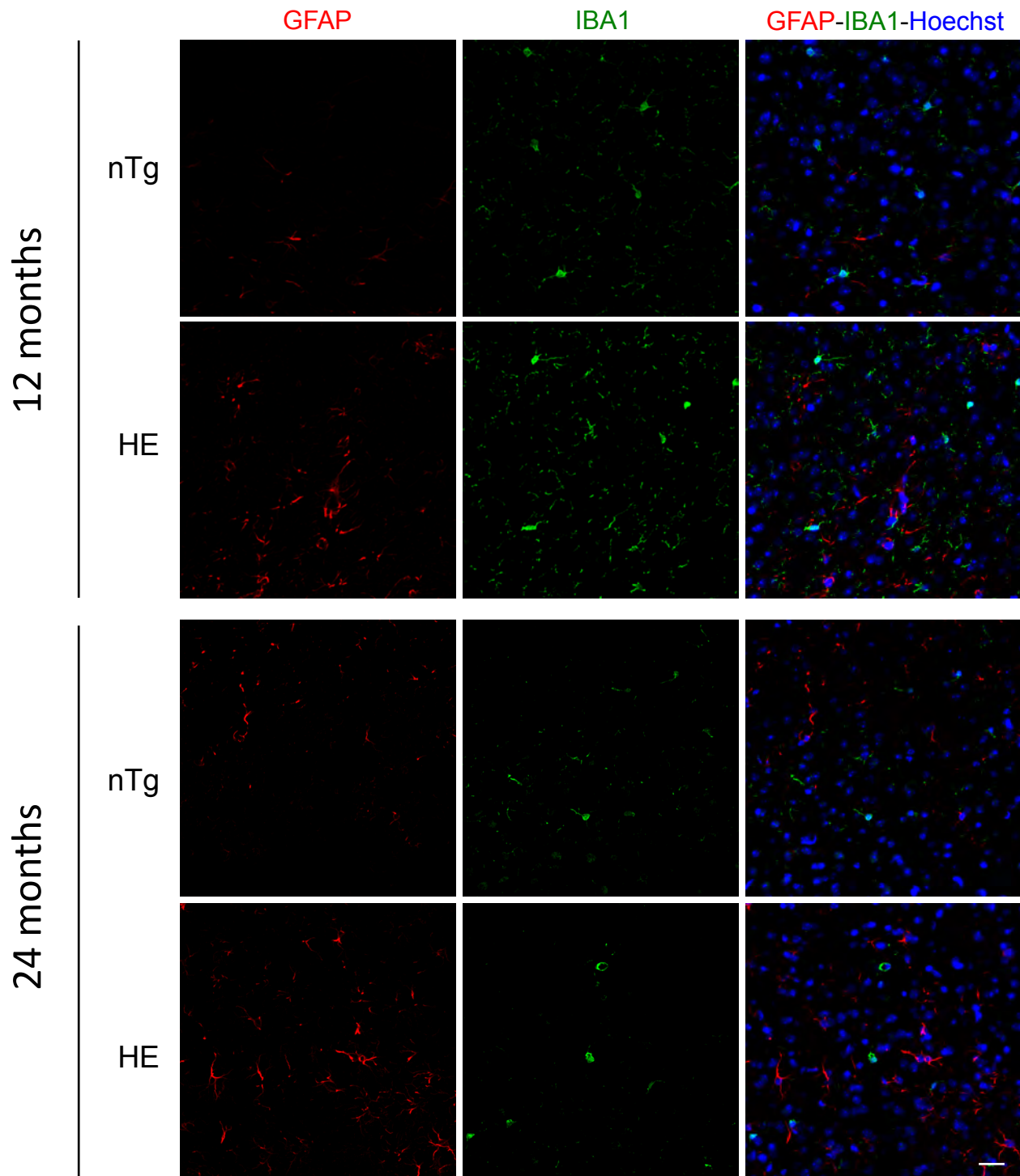
Motor neurons of 6 month-old HO mice contained cytoplasmic inclusions of various size positive for HA, p62 or ubiquitin. Nuclei were labelled with Draq5 (blue). Arrowheads show colocalizations of selected markers in the same inclusions.

Scale bar: 10µm.



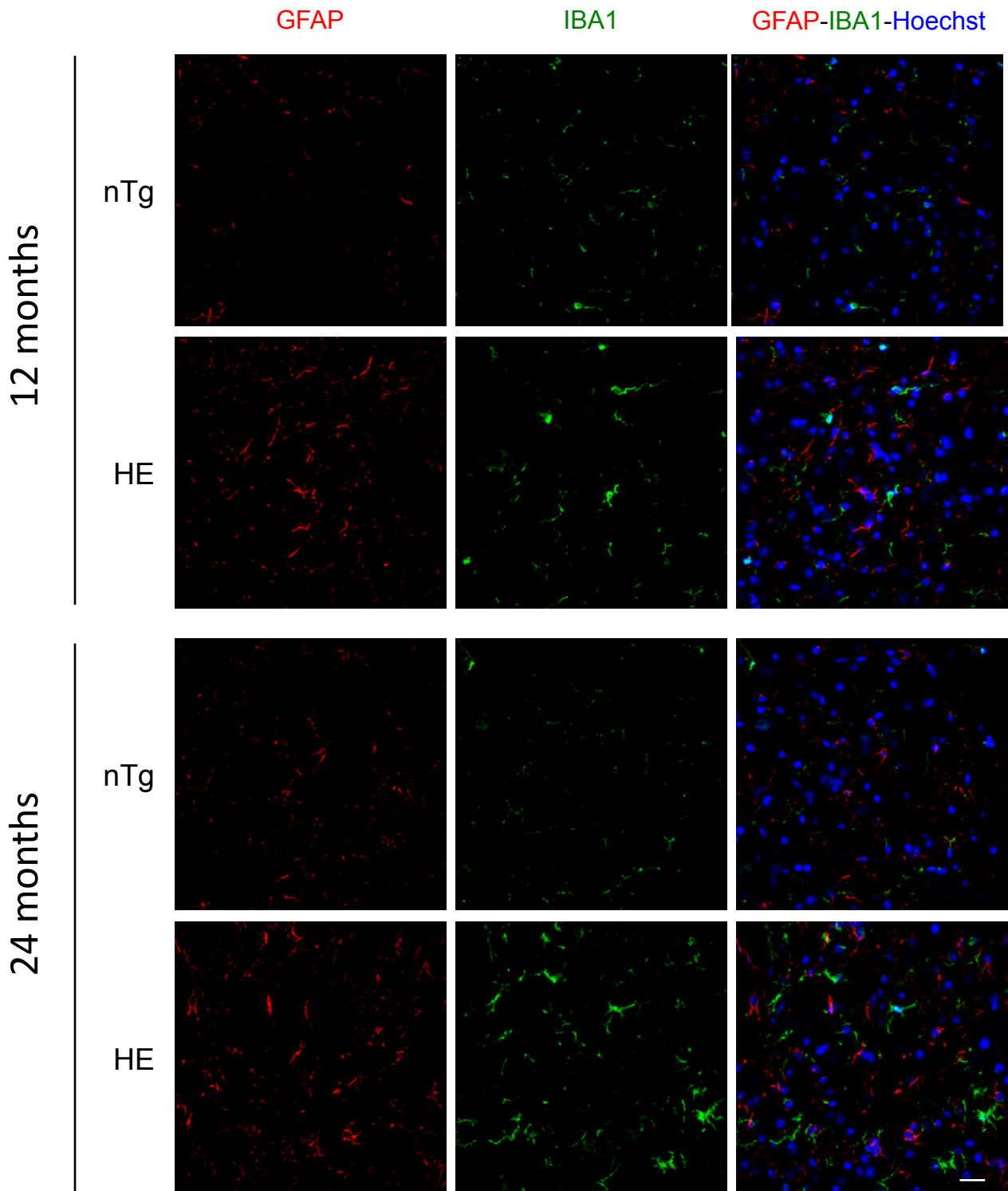
**Supplemental figure 10: FUS and TDP43 are normally localized in the nucleus of the neurons in HO mice.** Immunostaining showing Fus or TDP43 distribution in red in cortex of nTg and HO mice at 6 months of age. Nuclei (blue) were visualized with Hoechst 33342. FUS and TDP43 were strictly located within the nucleus as shown by the pink-purple colour after merging of respective red/blue pictures (high magnification, small pictures). HO: homozygous, nTg: non transgenic. Scale bar: low magnification: 50 $\mu$ m, high magnification: 5 $\mu$ m.



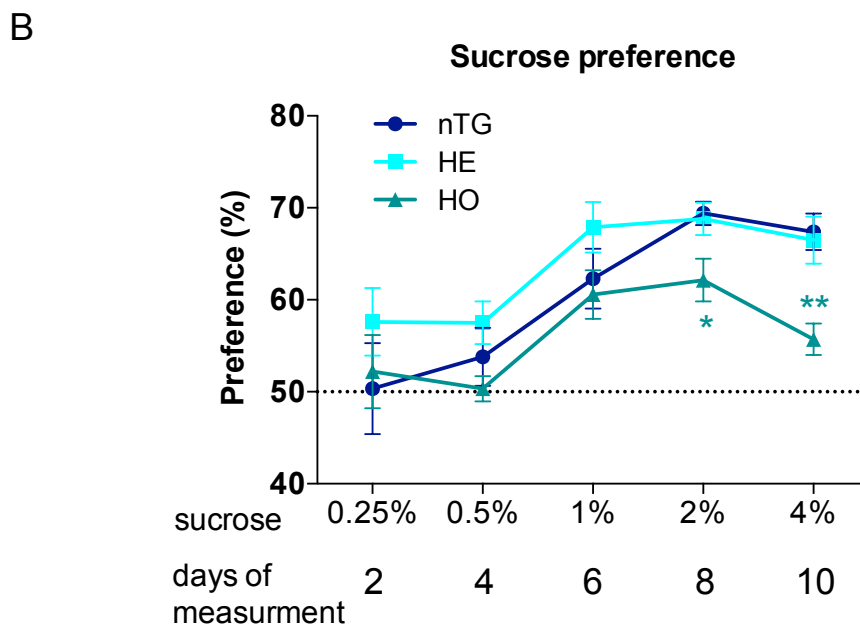
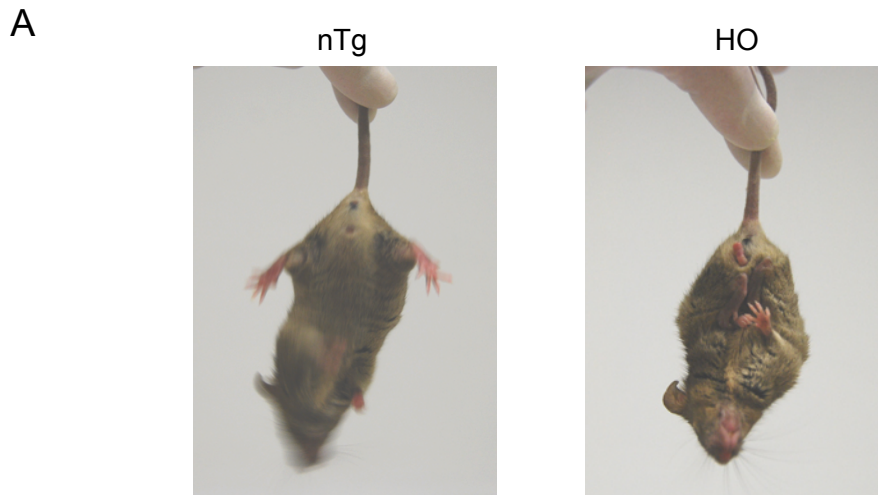


**Supplemental figure 11: Age-dependent increase of astrocytosis in cortex of HE mice.** Double immunolabelling showing GFAP (red) and IBA1 (green) immunoreactivities in the cortex of nTg and HE mice at 12 and 24 months of age. Nuclei were labelled with Hoechst 33346 (blue). GFAP immunoreactivity increased with age in HE mice. Note also the increase of GFAP immunoreactivity in HE mice compared to nTg mice. HE: hemizygous; nTg: non transgenic. Scale bar: 25µm.





**Supplemental figure 12: Age-dependent increase of astrocytosis and microgliosis in the spinal cord of HE mice.** Double immunolabelling showing GFAP (red) and IBA1 (green) immunoreactivities in the spinal cord of nTg and HE mice at 12 and 24 months of age. Nuclei were labelled with Hoechst 33346 (blue). GFAP and IBA1 immunoreactivities increased with age in HE mice. Note also the increase of GFAP and IBA1 immunoreactivities in HE mice compared to nTg mice. HE: hemizygous; nTg: non transgenic. Scale bar: 25 $\mu$ m.



**Supplemental figure 13:**

**A:** Representative pictures showing the alteration of hindlimb splay of HO mice when hold by tail compared to nTg mice.

**B:** Sucrose preference at 5 months of age. At 2% and 4% sucrose concentration sucrose preference was decreased in HO mice compared to HE and nTg mice. Values represent the mean±SEM, n=8-12, \*p<0.05, \*\*p<0.005 one-way ANOVA followed by uncorrected Fisher's LSD. For detailed procedure see material and methods section. HE: hemizygous, HO: homozygous, nTg: non transgenic.

**Supplemental table 1: primer sequences used for PCR.**

<b>Gene</b>	<b>Id</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
Transgene (genotyping)	<i>Tg</i>	GTCGGAACTCTTGGCACCTA	CCAATCTTGGCCATTTTCTT
TLA set 1	<i>Integration site</i>	GGCAGTTAACAAGAAGATGG	CCTCGTAACTCTCGATTCTG
TLA set 2	<i>Integration site</i>	CCCAAGTCCTTCAAATATCTC	GCTTTCTTCTTCGTCATCAG
Transgene copy number	<i>CHMP2B</i> <i>intron5</i>	GACTACGCTTACCCATACGAC	TAGCCCTCTGTGTACCTCGT
18s ribosomal RNA	<i>18S</i>	CGTCTGCCCTATCAACTTTCG	TTCCTTGGATGTGGTAGCCG
<i>Nicotinic Acetylcholine receptor alpha subunit</i>	<i>AChR<math>\alpha</math></i>	CCACAGACTCAGGGGAGAAG	AACGGTGGTGTGTGTTGATG
<i>ATPase, Ca<sup>2+</sup>-transporting plasma membrane 1</i>	<i>Atp2b1</i>	AGGAAGGGCTGTTTGAATCCT	ATGAAGGGTGTGCTAGGTGG
Charged Multivesicular Body Protein 2B (mouse)	<i>Chmp2B</i>	GAAGCTTACCGTCTGCCTCC	CCCCTAAAGCTTTGAGTTGAC
Glial fibrillary acidic protein	<i>Gfap</i>	TCGAGATCGCCACCTACAG	GTCTGTACAGGAATGGTGATGC
Ionized calcium-binding adapter molecule 1	<i>Iba1</i>	AGCTTTTGGACTGCTGAAGG	CAGCTCTAGGTGGGTCTTGG
<i>Myogenin</i>	<i>Myog</i>	GTCCAACCCCAACATCCA	CATTTCCCGCCACAC
<i>RNA Polymerase II polypeptide A</i>	<i>Pol2</i>	AATCCGCATCATGAACAGTG	CATCCATTTTATCCACCACC
<i>TATA box binding protein</i>	<i>Tbp</i>	CCAATGACTCCTATGACCCCTA	CAGCCAAGATTCACGGTAGAT

## Etude du continuum mécanistique et physiopathologique entre la Sclérose Latérale Amyotrophique et la Démence FrontoTemporale

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) et la Démence FrontoTemporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives fatales pour lesquelles il n'existe aucun traitement curatif. Ces deux maladies sont liées par un continuum clinique que corroborent des arguments génétiques et histologiques. Aujourd'hui, environ 15% des patients atteints de SLA développent par la suite une DFT et inversement. En 2006, des mutations dans le gène *CHMP2B* ont été découvertes chez des patients atteints de SLA et de DFT. Douze ans plus tard, les mécanismes pathologiques associés aux mutations de ce gène dans le syndrome SLA-DFT sont encore peu compris.

Pour pallier cela, nous avons étudié par plusieurs approches l'impact du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* dans un modèle murin. Les analyses transcriptomiques réalisées au niveau de la moelle épinière lombaire ont mis en lumière une dérégulation de plusieurs processus cellulaires, notamment la réponse inflammatoire et le métabolisme lipidique. De plus, nous avons mis en évidence au niveau neuronal une perturbation très précoce de la macroautophagie, avec un blocage dans l'étape finale de dégradation lysosomale associé à une répression de l'initiation de l'autophagie. Enfin, nous avons montré que l'expression neuronale du mutant *CHMP2B<sup>intron5</sup>* entraîne au niveau périphérique une atrophie musculaire et une altération structurale et fonctionnelle de la jonction neuromusculaire.

Mots-clés : Sclérose Latérale Amyotrophique, Démence FrontoTemporale, *CHMP2B<sup>intron5</sup>*, autophagie, étude transcriptomique, jonction neuromusculaire.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and FrontoTemporal Dementia (FTD) are two fatal and incurable neurodegenerative diseases. These two diseases share a clinical continuum supported by genetic and histological arguments. Today, about 15% of ALS patients develop later FTD symptoms and reversely. In 2006, mutations in the *CHMP2B* gene were discovered in ALS-FTD patients. Twelve years later, pathological mechanisms associated with mutations of this gene in the ALS-FTD syndrome are poorly understood.

For a better understanding of *CHMP2B<sup>intron5</sup>*-related pathological mechanisms, we studied by different approaches the impact of this mutation in a mouse model. Transcriptomic analysis on lumbar spinal cord highlighted a panel of deregulated cellular pathways, including the inflammatory response and the lipid metabolism. In addition, we showed an early disturbance of macroautophagy, with a blockage of final degradation step associated with a repression of autophagy initiation. Finally, our results show that neuron specific expression of *CHMP2B<sup>intron5</sup>* leads to muscular atrophy and structural and functional alterations of neuromuscular junctions.

Key words: Amyotrophic Lateral Sclerosis, Frontotemporal Dementia, *CHMP2B<sup>intron5</sup>*, autophagy, transcriptomic study, neuromuscular junction.