



**HAL**  
open science

# Rôle des cellules souches musculaires dans la physiopathologie de l'amyotrophie spinale

Jordan Mecca

► **To cite this version:**

Jordan Mecca. Rôle des cellules souches musculaires dans la physiopathologie de l'amyotrophie spinale. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS261 . tel-02968362

**HAL Id: tel-02968362**

**<https://theses.hal.science/tel-02968362>**

Submitted on 15 Oct 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.

## Thèse de doctorat de Sorbonne Université

Ecole Doctorale 515, Complexité Du Vivant

Spécialité : biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 20 mars 2019 par Jordan MECCA pour  
obtenir le grade de docteur de Sorbonne Université

---

# **Rôle des cellules souches musculaires dans la physiopathologie de l'amyotrophie spinale**

---

Centre de Recherche en Myologie, UMRS 974

Sorbonne Université – INSERM - AIM

Composition du jury :

Helge AMTHOR, Rapporteur

Cécile MARTINAT, Rapportrice

Delphine DUPREZ, Examinatrice

Suzie LEFEBVRE, Examinatrice

Pascal MAIRE, Examineur

Frédéric RELAIX, Directeur de thèse

Membres invités :

Martine BARKATS, Directrice de thèse

Nathalie DIDIER, Encadrante



## **Titre : Rôle des cellules souches musculaires dans la physiopathologie de l'amyotrophie spinale**

### **Résumé :**

L'amyotrophie spinale (SMA), est une maladie neuromusculaire caractérisée par une dégénérescence des motoneurones (MN), une atrophie musculaire et une paralysie conduisant à une mort précoce dans les formes les plus sévères. La SMA est due à une réduction de la protéine ubiquitaire SMN résultant de mutations homozygotes dans le gène *SMN1*. Longtemps considérée comme une pathologie purement neuronale, la SMA apparaît aujourd'hui comme une pathologie multisystémique affectant de nombreux tissus périphériques, dont le muscle squelettique et les cellules souches musculaires (CS). Avec les premiers succès de la thérapie génique basée sur l'AAV9-SMN, émergent aussi des incertitudes quant aux effets à long terme de ces thérapies en particulier sur l'intégrité du système neuromusculaire. Ces travaux se sont inscrits dans cette problématique, et apportent un nouvel éclairage sur l'implication des CS musculaires dans la physiopathologie de la SMA. Nous avons observé une diminution du nombre de CS dans les muscles de patients SMA Type II, qui pourrait résulter d'un défaut d'engagement des CS vers la quiescence et d'une perte des CS quiescentes par apoptose. Grâce au modèle murin *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*, nous avons démontré que cette déplétion des CS induite par le déficit en SMN induit, à long terme, une perte sélective des MN- $\alpha$  accompagnée de changements phénotypiques des fibres musculaires. Enfin, nous avons montré une dérégulation du profil d'expression des miARN dans les CS de souris SMA, et identifié de potentielles cibles thérapeutiques pour le développement de futures stratégies thérapeutiques combinées, restaurant SMN et préservant le système neuromusculaire sur le long terme.

### **Title: Role of muscle stem cells in spinal muscular atrophy physiopathology**

### **Abstract :**

Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disorder characterized by motor neurons (MN) degeneration, muscle atrophy and paralysis leading to premature death in the most severe forms. SMA is due to a reduction of the ubiquitous protein called SMN resulting from homozygous mutations in *SMN1* gene. Long considered as a purely neuronal disease, SMA appears now as a multisystemic disease affecting many peripheral tissues, including skeletal muscle and muscle stem cells (SC). With the first successes of AAV9-SMN-based gene therapy, uncertainties emerge about the long-term effects of these therapies, particularly regarding the integrity of the neuromuscular system. This work is in line with this problematic, and shed new light on the involvement of muscle SC in SMA pathophysiology. We observed a decreased number of SC in the muscles of SMA Type II patients, which could result from reduced ability of SMN-deficient SC to commit to quiescence and a loss of quiescent SC by apoptosis. Using the murine conditional KO model *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*, we demonstrated that this SC-depletion induced by SMN deficiency leads, in the long term, to a selective loss of  $\alpha$ -MN and phenotypic changes in muscle fibers. Finally, we showed a deregulation of miRNA expression profile in SMA mouse SC, and identified potential new therapeutic targets for the development of future combined therapeutic strategies, restoring SMN and preserving the neuromuscular system in the long term.







## Table des matières

|   |    |
|---|----|
| Liste des illustrations.....  | 9  |
| Liste des tableaux.....   | 11 |
| I. Introduction .....   | 13 |
| 1.1. Le système neuromusculaire.....  | 15 |
| 1.1.1. Définition et histologie des muscles squelettiques .....   | 15 |
| 1.1.2. Les motoneurones.....  | 15 |
| 1.1.3. La jonction neuromusculaire.....   | 17 |
| 1.1.4. Les fibres musculaires .....   | 20 |
| 1.1.5. Les cellules souches musculaires adultes : les cellules satellites.....  | 22 |
| 1.2. L'amyotrophie spinale .....  | 27 |
| 1.2.1. Définition et classification des différents types de SMA .....   | 27 |
| 1.2.2. Le diagnostic et suivi des patients.....   | 27 |
| 1.2.3. Les gènes <i>SMN1</i> et <i>SMN2</i> .....   | 30 |
| 1.2.4. Les fonctions de la protéine SMN .....   | 34 |
| 1.2.5. Les modèles animaux .....  | 38 |
| 1.2.6. Les traitements de la SMA .....  | 41 |
| 1.2.7. Du concept d'une maladie du motoneurone à une maladie multi-systémique   | 46 |
| 1.3. La voie de l'ARN interférence (ARNi).....  | 61 |
| 1.3.1. Définition.....  | 61 |
| 1.3.2. Voie canonique de biogenèse des miARN.....   | 62 |
| 1.3.3. Rôle non canonique de Dicer 1 .....  | 66 |
| 1.3.4. Rôle de la voie de biogenèse des miARN dans la physiopathologie de la SMA.   | 66 |
| 1.3.5. Rôle des miARN dans la régulation des cellules satellites du muscle.....   | 68 |
| II. Objectifs .....   | 71 |
| III. Matériel et méthodes .....   | 77 |
| IV. Résultats.....  | 87 |
| 4.1. Etude du rôle de SMN dans la fonction des cellules satellites musculaires.....   | 89 |
| 4.1.1. Les muscles de patients SMA présentent une réduction du nombre de cellules satellites Pax7+.....                                 | 89 |
| 4.1.2. La myogenèse post-natale des souris SMA est perturbée.....   | 91 |
| 4.1.3. Génération d'un nouveau modèle murin KO conditionnel inducible <i>Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;</i> <i>Smn<sup>F7/F7</sup></i> ..... | 92 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 4.1.4. | Le déficit en SMN induit la mort par apoptose des CS quiescentes, conduisant à une perte du pool de CS dans les muscles adultes .....   | 94  |
| 4.2.   | Etude du rôle des CS musculaires dans la physiopathologie de la SMA .....   | 96  |
| 4.2.1. | Evaluation de la spécificité de la recombinaison par la Cre recombinase ERT2 sous le contrôle du promoteur Pax7 .....   | 97  |
| 4.2.2. | La déplétion des CS induite par le déficit en SMN n'affecte pas significativement la survie ni les capacités motrices des souris adultes sédentaires .....                    | 98  |
| 4.2.3. | Changements phénotypiques des fibres musculaires dans les muscles des souris <i>Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;</i> <i>Smn<sup>F7/F7</sup></i> .....                                | 103 |
| 4.2.4. | Aucun défaut morphologique des JNM n'est observable dans les muscles des souris <i>Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;</i> <i>Smn<sup>F7/F7</sup></i> 6mois post-TMX .....              | 105 |
| 4.2.5. | Un effort physique modéré déclenche l'apparition d'un phénotype sévère chez les souris <i>Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;</i> <i>Smn<sup>F7/F7</sup></i> sans affecter les MN ..... | 107 |
| 4.3.   | Etude des mécanismes moléculaires en aval de SMN dans les CS musculaires .....  | 113 |
| 4.3.1. | Le profil d'expression des miARN est perturbé dans les CS des souris SMA ...  | 113 |
| 4.3.2. | La localisation nucléaire de Dicer 1 dans les CS est perturbée par la perte de SMN  | 116 |
| V.     | Discussion.....   | 119 |
|        | Bibliographie .....   | 135 |

## Liste des illustrations

|   |     |
|---|-----|
| FIGURE 1 : ORGANISATION DU SYSTEME NEUROMUSCULAIRE.....   | 15  |
| FIGURE 2 : CLASSIFICATION DES MN INFERIEURS.....  | 16  |
| FIGURE 3 : COMPOSANTS CELLULAIRES DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE.....   | 17  |
| FIGURE 4 : ORGANISATION DES ELEMENTS CONTRACTILES DANS LA FIBRE MUSCULAIRE.....   | 20  |
| FIGURE 5 : SCHEMA REPRESENTANT LE COMPORTEMENT DES CS AU COURS DE LA MYOGENESE POST NATALE ET DE LA REGENERATION DU MUSCLE ADULTE. ....   | 23  |
| FIGURE 6 : SCHEMA DES GENES SMN1 ET SMN2, DE LEURS TRANSCRITS ET DE LA PROTEINE SMN...  | 31  |
| FIGURE 7 : LA MATURATION DES SNARN.....   | 34  |
| FIGURE 8 : SCHEMA DES DIFFERENTS ORGANES AFFECTES DANS LA SMA .....   | 56  |
| FIGURE 9 : SCHEMA DE LA VOIE CANONIQUE DE MATURATION DES MIARN. ....  | 62  |
| FIGURE 10 : INTERACTIONS PROTEIQUES ENTRE SMN ET LA VOIE DE BIOGENESE DES MIARN. ....   | 67  |
| FIGURE 11 : LE POOL DE CS PAX7+ EST REDUIT DANS LES MUSCLES DES PATIENTS SMA TYPE II. ....  | 90  |
| FIGURE 12 : LE COMPORTEMENT DES CS EST PERTURBE AU COURS DE LA MYOGENESE POST-NATALE DES SOURIS SMA TRES SEVERE.....  | 92  |
| FIGURE 13 : PERTE DE LA LOCALISATION NUCLEAIRE DE SMN DANS LES CS DES MUSCLES PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/+</sup> ET PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/F7</sup> , APRES 2 INJECTIONS DE TAMOXIFENE. ....  | 93  |
| FIGURE 14 : LA PERTE D'UN OU DES 2 ALLELES DE SMN CONDUIT A UNE MORT RAPIDE PAR APOPTOSE DES CS QUIESCENTES DU MUSCLE ADULTE.. ....   | 94  |
| FIGURE 15 : L'ABLATION PARTIELLE OU COMPLETE DE SMN CONDUIT A LA DEPLETION DU POOL DE CS QUIESCENTES DANS LES MUSCLES DES SOURIS PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/+</sup> ET PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/F7</sup> .....  | 95  |
| FIGURE 16 : AUCUN EVENEMENT DE RECOMBINAISON N'EST OBSERVE DANS LA MOELLE EPINIERE DU MODELE MURIN RAPPORTEUR PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;ROSA26-MTMG. ....  | 97  |
| FIGURE 17 : LA PERTE DES CS N'AFECTE PAS SIGNIFICATIVEMENT LA SURVIE NI LES CAPACITES MOTRICES DES SOURIS PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/+</sup> ET PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/F7</sup> EN CONDITIONS HOMEOSTATIQUES. VE DANS LA MOELLE EPINIERE DU MODELE MURIN RAPPORTEUR PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;ROSA26-MTMG..... | 99  |
| FIGURE 18 : LE NOMBRE DE MN EST SIGNIFICATIVEMENT REDUIT DANS LES MOELLES EPINIERES DES SOURIS PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/+</sup> ET PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/F7</sup> 6 MOIS POST-TMX.. ....   | 100 |
| FIGURE 19 : LA DEPLETION DES CS MUSCULAIRES INDUITE PAR LE DEFICIT EN SMN AFFECTE SELECTIVEMENT LES MN ALPHA EN EPARGNANT LES MN GAMA. ....   | 102 |
| FIGURE 20 : L'ABLATION DE SMN DANS LES CS CONDUIT A DES CHANGEMENTS PHENOTYPIQUES DES FIBRES MUSCULAIRES A LONG TERME.....  | 104 |
| FIGURE 21 : AUCUN DEFAUT MORPHOLOGIQUE DES JNM N'EST OBSERVABLE DANS LES MUSCLES DES SOURIS PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/F7</sup> 6 MOIS POST-TMX.....  | 105 |
| FIGURE 22 : L'EFFORT PHYSIQUE AFFECTE LE PHENOTYPE GENERAL DES SOURIS PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/F7</sup> . ....  | 107 |
| FIGURE 23 : UN PROTOCOLE D'EXERCICE MODERE N'AFECTE PAS L'INTEGRITE DES MN CHEZ LES SOURIS PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/F7</sup> .....  | 109 |
| FIGURE 24 : UN EXERCICE MODERE SUR UNE COURTE PERIODE INDUIT UNE DIMINUTION DE L'ARE DES FIBRES SANS MODIFICATION DU PHENOTYPE MUSCULAIRE CHEZ LES SOURIS PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/F7</sup> . ....  | 111 |

|  |     |
|--|-----|
| FIGURE 25 : UN EFFORT PHYSIQUE MODERE N’AFFECTE PAS LA MORPHOLOGIE DES JNM DES SOURIS<br>PAX7 <sup>CREERT2/+</sup> ;SMN <sup>F7/F7</sup> .....                 | 112 |
| FIGURE 26 : IDENTIFICATION DES MIARN DEREGULES DANS LES CS PURIFIEES A PARTIR DES SOURIS<br>SMA TRES SEVERES HSMN2 PAR ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE SUR PUCE. .... | 113 |
| FIGURE 27 : LA PERTE DE SMN ENTRAINE LA DEREGULATION DES MYO-MIR 206-489 SANS<br>ACTIVATION DES CS 24H APRES LA PREMIERE INJECTION DE TAMOXIFENE.....          | 115 |
| FIGURE 28 : L’INDUCTION DE LA DELETION DE SMN CONDUIT A LA PERTE DE LOCALISATION<br>NUCLEAIRE DE DICER 1 DANS LES CS IN VIVO.....                              | 117 |
| FIGURE 29 : MODELE PROPOSE POUR LE ROLE DES CS MUSCULAIRES DANS LA PERTE SELECTIVE DES<br>MN-ALPHA AU COURS DE LA SMA. ....                                    | 129 |
| FIGURE 30 : MODELE HYPOTHETIQUE DE L’IMPACT DU DEFICIT EN SMN SUR LA VOIE DES MIARN. ....  | 130 |
| FIGURE 31 : SCHEMA DE L’APPROCHE THERAPEUTIQUE PROPOSEE POUR PRESERVER L’INTEGRITE DU<br>SYSTEME NEUROMUSCULAIRE A LONG TERME CHEZ LES PATIENTS SMA. ....      | 132 |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| TABLEAU 1 : ROLE DES CS DANS L'HOMÉOSTASIE, L'EXERCICE MUSCULAIRE ET LA MAINTENANCE DES JNM.....   | 26 |
| TABLEAU 2 : CLASSIFICATION DES DIFFÉRENTS TYPES DE SMA. ....                                       | 28 |
| TABLEAU 3 : FORMES DE SMA NON LIÉES A SMN1.....  | 29 |
| TABLEAU 4 : MODELES MURINS SMA. ....   | 39 |
| TABLEAU 5 : MODELES DE DEPLETION CIBLÉE DE SMN DANS LES MN.....                                    | 47 |
| TABLEAU 6 : MODELES MURINS DE RESTAURATION DE SMN DANS LES MN.....                                 | 48 |
| TABLEAU 7 : LISTE DES MIARN DEREGULES DANS DIFFERENTS MODELES IN VITRO ET IN VIVO DE SMA.<br>..... | 69 |
| TABLEAU 8 : SEQUENCE DES AMORCES UTILISEES POUR LE GENOTYPAGE DES DIFFERENTS MODELES.<br>.....     | 80 |
| TABLEAU 9 : PROTOCOLE HEBDOMADAIRE D'EXERCICE MODERE. ....   | 80 |
| TABLEAU 10 : SEQUENCE DES AMORCES UTILISEES POUR LA QPCR. ....                                     | 84 |
| TABLEAU 11 : CARACTERISTIQUES DES PATIENTS INCLUS DANS L'ETUDE.....                                | 89 |



# I. Introduction

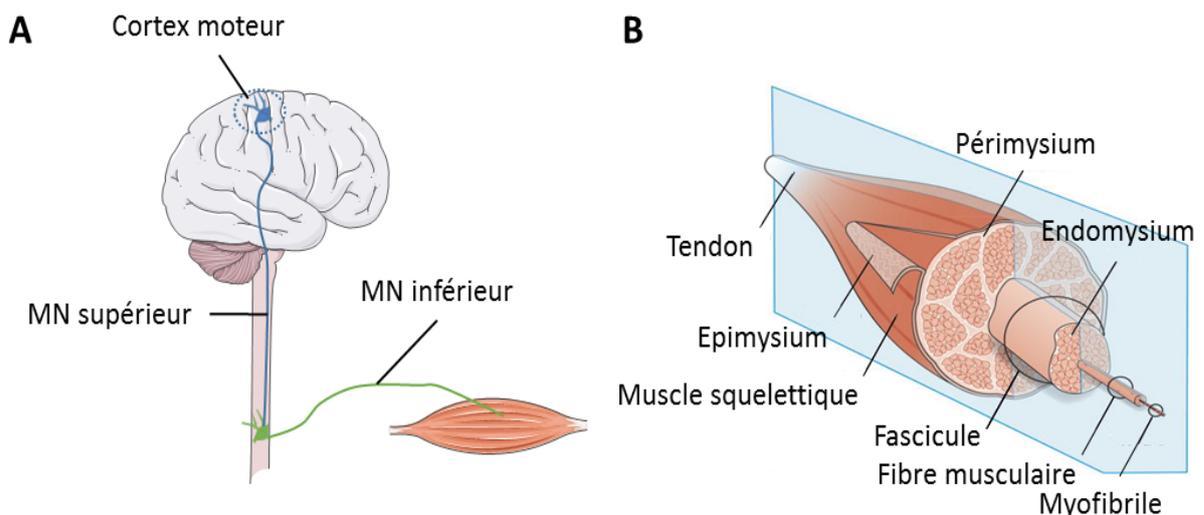


## 1.1. Le système neuromusculaire

### 1.1.1. Définition et histologie des muscles squelettiques

Le muscle squelettique est le tissu le plus abondant de l'organisme et représente près de 40% du poids. La fonction principale de ce tissu est la contraction musculaire qui est initiée par le cerveau et est transmise jusqu'à la fibre musculaire par les motoneurone et les jonctions neuromusculaires (JNM) jusqu'à la fibre musculaire (Fig 1A). Le muscle se caractérise également par sa grande capacité de régénération permise par les cellules souches ou cellules satellites (CS) localisées au contact des fibres.

Au niveau macroscopique (Fig 1B), chaque fibre musculaire est entourée d'une membrane de matrice extracellulaire appelée également lame basale et formant l'endomysium. A l'échelle supérieure les fibres musculaires vont former des faisceaux entourés de périnysium et l'ensemble de ces faisceaux forment le muscle lui-même entouré d'une membrane : l'épimysium. Enfin l'ensemble des fibres musculaires sont rattachées aux os grâce aux tendons.



**Figure 1 : Organisation du système neuromusculaire. (A) Contrôle de la contraction. (B) Divisions macroscopiques du muscle. Fig1 B d'après Gillies AR et Al., 2011.**

### 1.1.2. Les motoneurones

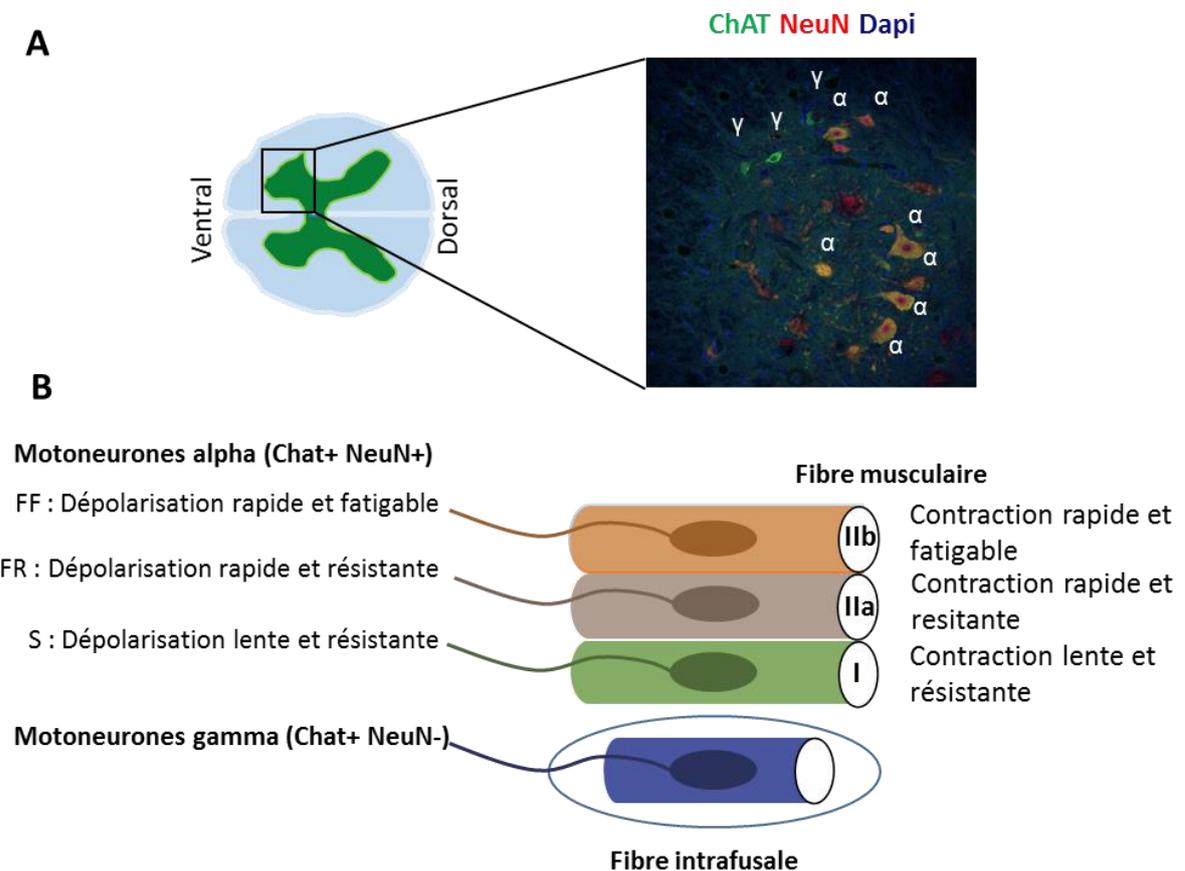
La contraction des muscles squelettiques est un mécanisme pouvant être conscient comme lors de la mobilisation du bras pour attraper un objet, ou inconscient comme cela est le cas pour le maintien de la posture. L'envoi du signal de contraction est organisé en plusieurs étapes débutant dans le cortex moteur qui programme le mouvement (Fig 1A). Depuis le cortex moteur, part le motoneurone (MN) supérieur qui descend le long de la moelle épinière. En fonction du muscle innervé, l'axone de ce MN s'arrête au niveau vertébral correspondant et fait une synapse avec un second MN appelé MN inférieur situé dans la corne ventrale de la moelle épinière (Fig 1A). L'axone de ce second MN sort des vertèbres et parcourt les tissus

pour innerver directement le muscle. Au cœur de la moelle épinière, plus de 120000 de MN assurent la contraction de l'ensemble des muscles squelettiques composant le corps humain (pour revue (Kanning et al., 2010). L'ensemble des fibres musculaires innervées par le même MN (unité motrice, UM) sont réparties dans l'ensemble du muscle en conditions physiologiques pour assurer une contraction homogène du tissu (Larsson and Ansved, 1995).

Les MN inférieurs sont classés en plusieurs catégories. La première classification se base sur le type de fibre musculaire innervée (Fig 2). Ainsi on distingue les MN alpha innervant les fibres musculaires, les MN gamma innervant les fibres intrafusales et les MN beta innervant les 2 types de fibres.

Plusieurs caractéristiques cellulaires permettent de distinguer ces 3 classes de MN :

- La taille du corps cellulaire (soma) : les MN gamma sont plus petits que les MN alpha



**Figure 2 : Classification des MN inférieurs.** (A) Identification des MN alpha et gamma par IF avec des anticorps dirigés contre ChAT (vert), NeuN (rouge). Les noyaux sont marqués par le DAPI. (B) Classifications des MN selon la fibre innervée et les caractéristiques électrophysiologiques. Fig1 B d'après Kanning KC et Al., 2010.

(Burke et al., 1977; Shneider et al., 2009; Westbury, 1982).

- les marqueurs protéiques : les MN alpha expriment l'enzyme Chatécolamine transférase (ChAT) et le facteur nucléaire NeuN (Fig 2A) (Feldberg and Vogt, 1948; Friese et al., 2009;

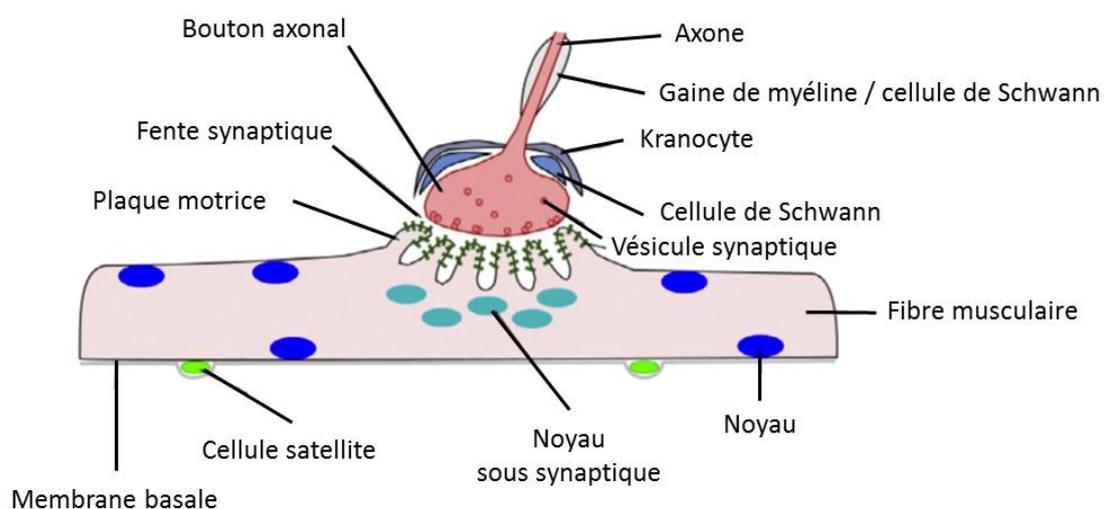
Mullen et al., 1992; Shneider et al., 2009), les MN gamma expriment la ChAT et le récepteur nucléaire ERR3 (Friese et al., 2009; Shneider et al., 2009).

Une sous-classification existe parmi les MN alpha avec 3 types distinguables selon la vitesse de dépolarisation et la résistance à la fatigue du MN (Fig 2B) : S (slow, lente et résistant à la fatigue), FR (fast, rapide et résistant à la fatigue), FF (fast, rapide et fatigable) (Kernell, 2003; Kernell et al., 1999). Ces caractéristiques électrophysiologiques sont à l'origine de l'expression des différents types de myosines dans la fibre musculaire (respectivement I, IIa et IIx/IIb, voir la partie correspondante). Il est également possible de classer morphologiquement les différents types de MN alpha sur la base de la taille des différents somas (Cullheim et al., 1987).

Le rétrocontrôle de la contraction est effectué par un arc réflexe intégrant les informations proprioceptives pour modifier les afférences des MN. La partie sensorielle est composée de neurones entourant un type de fibre particulière retrouvée dans le muscle : les fibres intrafusales encapsulées dans une enveloppe de la lame basale. Ces fibres sont spécifiquement innervées par les MN gamma leur permettant de garder une tension appropriée durant la contraction et le relâchement musculaire (Fig 2B) (pour revue : Stifani, 2014). Lorsqu'une variation de tension est détectée par le muscle, le neurone sensoriel entourant la fibre fait remonter l'information jusqu'à la moelle épinière où l'information est transmise aux MN via des interneurons ou est remontée le long de la colonne vertébrale jusqu'à son intégration dans le cerveau.

### 1.1.3. La jonction neuromusculaire

#### 1.1.3.1. Composition et organisation



**Figure 3 : Composants cellulaires de la jonction neuromusculaire.** D'après Liu.W et Al., 2018.

Au niveau du muscle, le MN forme une synapse avec la fibre musculaire appelée jonction neuromusculaire (JNM) caractérisée par une forme typique de son bon fonctionnement et qui

varie selon les espèces (Jones et al., 2017; Sanes and Lichtman, 2001). La terminaison axonale du MN est élargie et spécialisée dans la transmission de neurotransmetteurs (acétylcholine, Ach) contenus dans des vésicules (quantas) qui fusionneront avec la membrane plasmique lors de l'arrivée du potentiel d'action (Fig 3). De l'autre côté de la JNM se trouve la membrane post synaptique située sur la fibre musculaire appelée plaque motrice. En microscopie électronique, cette région est caractérisée par de nombreuses invaginations augmentant la surface de contact avec le bouton synaptique et la présence des récepteurs à l'Ach (AchR) situés aux sommets des crêtes. Enfin l'espace entre le bouton synaptique et la plaque motrice est appelé fente synaptique et sépare ces deux éléments (Fig 3). De nombreux éléments sont situés dans cet espace permettant le maintien de la JNM, la diffusion de l'Ach et sa dégradation.

En plus des fibres musculaires et des MN, d'autres cellules forment la structure de la JNM : les cellules de Schwann et les kranocytes (Court et al., 2008). Les cellules de Schwann sont retrouvées à l'extérieur de la colonne vertébrale et entourent le MN par une gaine de myéline augmentant la vitesse de contraction (Fig 3). Pour la JNM, les cellules de Schwann dites terminales assurent deux rôles principaux : le maintien sur le long terme de la structure en sécrétant des facteurs trophiques et d'adhésion, et la modulation de la transmission neuromusculaire (Fig 3). La fonction des kranocytes est assez peu décrite et serait plutôt liée aux processus de régénération de la JNM (Court et al., 2008). Enfin très récemment, des études ont montré que les cellules souches musculaires sont également localisées dans l'environnement proche des JNM et pourraient avoir un rôle dans la régénération et le maintien des JNM. Ce point sera traité plus en détail dans la partie concernant le rôle des cellules souches musculaires dans le muscle.

### **1.1.3.2. Fonctionnement**

Le fonctionnement de la JNM repose sur le déclenchement de l'ouverture de canaux sodiques par la fixation d'un neurotransmetteur unique : l'Ach. Cette molécule est synthétisée dans les MN à partir du coenzyme A et de la choline par la choline acétyl transférase (ChAT) (Dale and Dudley, 1929). L'arrivée du Potentiel d'Action (PA) le long de l'axone entraîne l'ouverture de canaux calciques au niveau du bouton synaptique. L'augmentation de la concentration locale en  $Ca^{2+}$  entraîne la fusion des vésicules avec la membrane axonale et la libération de l'Ach dans la fente synaptique par exocytose (Pour revue Liu and Chakkalakal, 2018). Ce neurotransmetteur se fixe sur son récepteur (AchR) situé sur le sarcolème au sommet des crêtes de la plaque motrice. L'AchR est un canal sodique constitué de 5 sous unités ( $2\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  qui est retrouvée dans les JNM immatures à la place de  $\epsilon$ ). L'Ach se lie sur les 2 sous unités Alpha du récepteur induisant un changement de conformation du canal permettant le passage principalement de cations  $Na^+$ . L'entrée massive de ces ions déclenche à son tour l'ouverture d'autres canaux voltages dépendants et allant jusqu'à l'ouverture des canaux calciques situés sur le réticulum sarcoplasmique et déclenchant la contraction. La

contraction est rapidement terminée par la dégradation de l'Ach par l'acétylcholine estérase. Cette enzyme est produite par les noyaux sous synaptiques de la fibre musculaire et elle est accrochée à la protéine ColQ située dans la fente synaptique (Jasmin et al., 1993). Cette enzyme permet le catabolisme l'Ach en acétate et choline qui retourneront dans le bouton synaptique, entraînant la fermeture de l'AchR (Omar and Bhimji, 2018).

### **1.1.3.3. Formation, maintenance et mécanismes de bourgeonnement**

La formation de la JNM est postérieure à la formation des fibres musculaires. Avant l'arrivée de l'axone plusieurs groupes d'AchR se forment au centre de la fibre musculaire (Kummer et al., 2006). Lors de la maturation de la JNM, la morphologie de la plaque motrice se modifie pour passer d'une architecture plane à la structure typique en forme de bretzel (Sanes and Lichtman, 2001). Au niveau de la fibre musculaire, le noyau post synaptique se spécialise pour exprimer les protéines retrouvées dans la JNM (Merlie and Sanes, 1985; Schaeffer et al., 2001; Simon et al., 1992). L'AchR est modifié par l'expression des sous unités  $\epsilon$  au lieu de  $\gamma$  et par l'augmentation de sa densité au sommet des crêtes.

Plusieurs cas de figures peuvent affecter la JNM et son fonctionnement dont : la section du MN et les défauts progressifs du MN comme cela est observé dans plusieurs maladies neuromusculaires.

Dans la première situation, la réinnervation est permise par la repousse axonale qui est dirigée jusqu'au muscle par les cellules de Schwann.

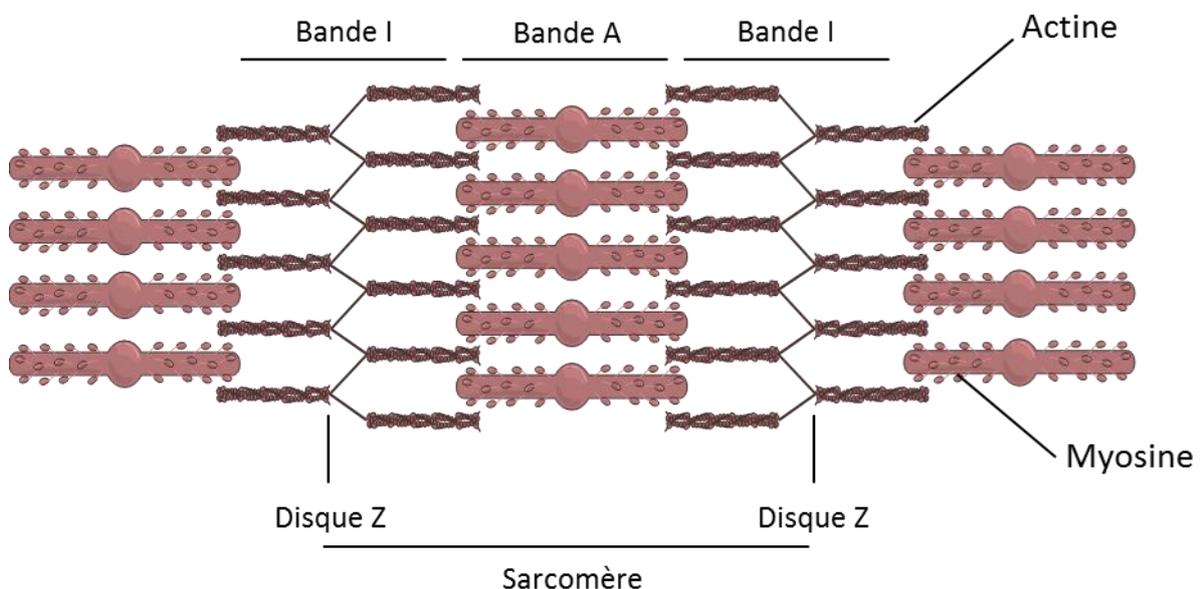
Dans le cas des maladies neuromusculaires, un même MN peut être à la fois dans une situation de dénervation et de réinnervation des fibres musculaires (Martineau et al., 2018). Il apparait cependant que le MN ne réinnervera pas la même fibre musculaire. La première étape de ce processus est la sécrétion par la fibre musculaire de signaux diffusibles dans un rayon de 200 $\mu$ m dont le miR206, le GDNF et Yap (Baudet et al., 2008; Gordon et al., 2004; Williams et al., 2009; Zhao et al., 2016). Dans un second temps, les cellules de Schwann terminales se placent sur la fente synaptique dénervée et produisent à leur tour des facteurs trophiques (Miledi and Slater, 1970; Son and Thompson, 1995; Zainul, 2014). La troisième étape est la formation de ponts cellulaires entre les cellules de Schwann se situant sur les plaques motrices dénervée et celles se trouvant sur une JNM fonctionnelle (Gordon et al., 2004). La formation de cette interaction est due à l'arrêt de la fixation d'Ach sur les récepteurs muscariniques de cellules de Schwann (Son and Thompson, 1995). Enfin, la quatrième et dernière étape est le bourgeonnement de l'axone et la réinnervation de la plaque motrice sur une durée de quelques jours (Love et al., 2003). Le bourgeonnement (sprouting) de l'axone augmente donc le nombre de fibres musculaires innervées par le même MN augmentant donc la taille de l'unité motrice. Ce processus peut compenser une diminution du nombre de MN allant jusqu'à 80% (Gordon et al., 1993).

De façon intéressante, il apparaît que l'activité neuromusculaire bloque la réinnervation des fibres musculaires (Tam and Gordon, 2003). En effet l'exercice physique (course sur tapis 8h/J et électrostimulation) sur des rats ayant subi une section d'une racine lombaire empêche les cellules de Schwann de former les ponts entre les plaques motrices. Le mécanisme en cause serait l'augmentation excessive de la concentration locale en Ach maintenant l'activation des récepteurs muscariniques présents sur les cellules de Schwann.

#### 1.1.4. Les fibres musculaires

##### 1.1.4.1. Constitution

Les fibres musculaires sont les principaux constituants du muscle. A la fin de la première moitié du XXème siècle, les études par microscopie électronique ont révélé une organisation alternée de bandes denses (bandes anisotropes, bandes A) et claires (bandes isotropes, bandes I) aux électrons (Hall et al., 1946). La bande I est elle-même séparée par la strie Z et l'espace compris entre 2 stries Z forme le sarcomère qui est l'unité minimale de contraction du muscle (Fig 4).



**Figure 4 : Organisation des éléments contractiles dans la fibre musculaire.**

Les protéines constitutives des sarcomères sont responsables des propriétés mécaniques passives et actives du muscle. Dans le sarcomère deux structures sont distinguables : les filaments fins constitués d'actine, de tropomyosine et de troponine et les filaments épais constitués de myosine. L'ensemble de ces constituants est relié par plusieurs protéines permettant le maintien de la structure et la transmission des forces. La fonction contractile repose sur l'interaction entre les filaments fins d'actine et épais de myosine ainsi que sur la libération d'énergie par l'hydrolyse de l'ATP. La dépolarisation de la membrane post synaptique (plaque motrice) par l'Ach entraîne l'ouverture de canaux calciques sur la membrane et le réticulum sarcoplasmique augmentant la concentration cytosolique en  $Ca^{2+}$ . Cet ion se fixe sur la troponine découvrant les sites d'interactions entre l'actine et la myosine.

Le rapprochement des sarcomères est alors permis par une cascade de réactions biochimiques impliquant la myosine comme moteur moléculaire et l'hydrolyse de l'ATP comme donneur d'énergie jusqu'à la recapture du  $Ca^{2+}$ .

Les myosines présentes dans le muscle squelettique font partie des myosines de classe II regroupant également les myosines retrouvées dans les muscles cardiaques et lisses (Schiaffino and Reggiani, 2011). Dans le muscle adulte, 4 isoformes des chaînes lourdes de myosine sont présentes à l'âge adulte. A partir de leur vitesse d'hydrolyse de l'ATP les myosines peuvent être classées de la plus lente à la plus rapide. Ainsi, chez la souris on distingue les myosines I, IIa, IIx et IIb (Bottinelli et al., 1994; Han et al., 2003; He et al., 2000; Stienen et al., 1996). Ces protéines sont exprimées par 4 gènes distincts : *MYH6*, *MYH2*, *MYH1* et *MYH4* pour respectivement les MYHC-I, IIa, IIx et IIb. Cependant bien que des transcrits pour le gène *MYH4* soient retrouvés dans les fibres musculaires humaines, seuls les rongeurs expriment la protéine (Gorza, 1990; Smerdu et al., 1994). Sauf situation particulière (réinnervation, exercice physique), une fibre musculaire donnée exprime seulement un des gènes des chaînes lourdes de myosines. Les fibres sont classées en 4 catégories selon le type de myosine et le métabolisme énergétique de la cellule : les fibres lentes et résistantes à la fatigue (type I, métabolisme oxydatif), intermédiaires (type IIa) et rapides et pas résistantes à la fatigue (type IIx/IIb, métabolisme glycolytique).

La classe de myosine exprimée est déterminée par le type de MN alpha innervant la fibre musculaire. En conditions physiologiques, les muscles sont composés d'une mosaïque de fibres dont les proportions varient selon : le rôle du muscle, sa localisation, l'âge et le sexe. Chez la souris, les muscles permettant de générer de la puissance (ex : un saut) comme le muscle vaste latéral situé dans la cuisse, sont composés de fibres de type rapide ou intermédiaire (I : 2,4% IIa : 40% , IIx : 24% et IIb : 23,5) (Bloemberg and Quadrilatero, 2012). A l'inverse, dans un muscle permettant le maintien de la patte comme le muscle soléaire, la majorité des fibres vont avoir un métabolisme lent et intermédiaire (I : 30,6% IIa : 49,1% , IIx : 11,8% et IIb : 3,1%) (Bloemberg and Quadrilatero, 2012).

#### **1.1.4.2. Adaptations de la fibre musculaire à la dénervation**

La transition des myosines suite à une dénervation peut prendre entre quelques jours pour les myosines intermédiaires (IIa, IIx) à plus de 14 jours pour l'isoforme rapide IIb (Termin and Pette, 1992). Pour un muscle donné, les possibilités de changements dépendent d'une part des proportions initiales des différents types de fibres musculaires et d'autre part de l'existence de différences intrinsèques entre les muscles (Schiaffino and Reggiani, 2011). Comme nous l'avons vu pour les MN, deux types de dénervation sont distinguables :

- Cas d'une dénervation complète :

Dans ces conditions, les fibres musculaires perdent l'ensemble des stimulations électriques (potentiels d'actions) et ont une transition des types lents/intermédiaires à

intermédiaires/rapides (Ciciliot et al., 2013). Dans le cas du muscle tibial antérieur (TA), très rapidement après la dénervation des changements apparaissent avec une augmentation des fibres IIa 14 jours après la dénervation et une légère diminution des fibres IIb (Raffaello et al., 2006). La perte de l'innervation conduit également à l'atrophie des fibres musculaires qui est variable selon le muscle. Enfin, la perte complète de stimulation nerveuse peut induire l'apoptose d'une fraction réduite de fibres musculaires et est détectable jusqu'à 7 mois post dénervation dans les modèles animaux (Siu, 2009).

- Cas d'une dénervation partielle :

Dans ce cas, la fibre musculaire est réinnervée par un axone adjacent. Etant donné que le type de MN est lié au type de la fibre, la réinnervation de la fibre peut conduire à un changement de l'expression du type de MyHC. Au niveau du tissu en entier cela peut avoir pour conséquence une variation dans la force développée par le muscle après stimulation (Gordon et al., 2004). Enfin, comme la réinnervation des fibres par un MN donné se fait dans une distance relativement proche, le muscle perd sa distribution en mosaïque ce qui crée des groupes de fibres exprimant le même type de myosine (Gordon and de Zepetnek, 2016).

### **1.1.5. Les cellules souches musculaires adultes : les cellules satellites**

#### **1.1.5.1. La mise en place de la population de cellules satellites durant la myogenèse post natale et rôle dans la régénération musculaire**

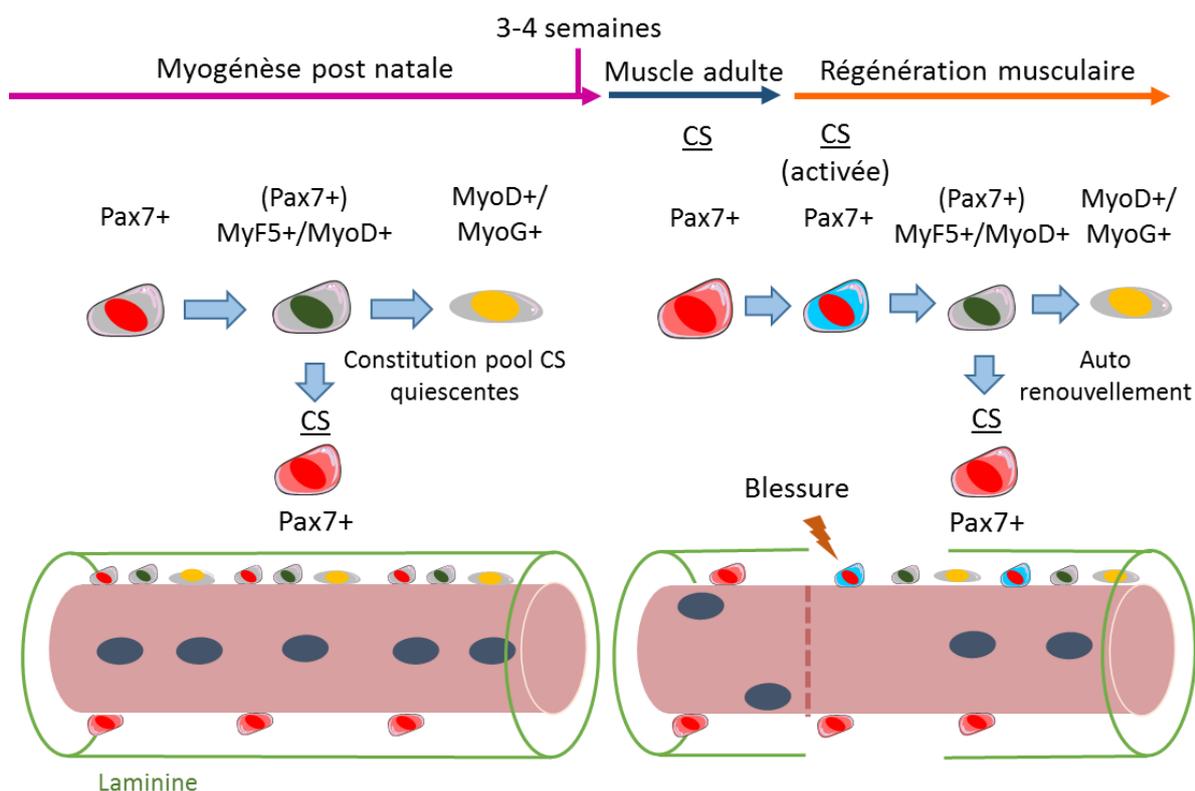
La découverte des cellules souches musculaires adultes a été faite à partir d'observations de coupes musculaires au microscope électronique dans les années 60. Ces cellules ont été nommées cellules satellites (CS) du fait leur position particulière sous la membrane basale, à la périphérie des fibres musculaires (Mauro, 1961). Comme les autres cellules souches retrouvées dans les tissus adultes, les SC sont dans un état de quiescence et sont capables après activation de proliférer et de se différencier pour régénérer de nouvelles fibres musculaires.

Chez la souris, la mise en place du pool de CS quiescentes se fait progressivement à partir de la fin de l'embryogénèse (E16.5) et durant une période de 3 semaines après la naissance appelée myogenèse post-natale. Juste avant la naissance, la majorité des progéniteurs myogéniques éteignent l'expression de Pax3, qui ne reste exprimé que par une petite sous population de CS à l'âge adulte (Fig 5) (Relaix et al., 2005; Tajbakhsh, 2009). Après la naissance, les progéniteurs Pax7+, activent l'expression des facteurs myogéniques Myf5, MyoD et Mrf4 (Kablar et al., 2003; Kassar-Duchossoy et al., 2004). Les cellules positives pour Pax7, MyF5, MyoD et Mrf4 (myoblastes) prolifèrent, puis s'engagent vers la différenciation en diminuant l'expression de Pax7 et en augmentant l'expression de la Myogénine (MyoG), pour finir par fusionner et ainsi constituer de nouvelles fibres musculaires. (Fig 5) (pour revue Tajbakhsh, 2009; Ohkawa et al., 2006). En parallèle, une partie des cellules vont éteindre l'expression de

MyoD et entrer en quiescence pour former un pool de SC retrouvé à l'âge adulte (Fig 5) (Crist et al., 2012; Olguin and Olwin, 2004; Seale et al., 2000).

Lors d'un dommage musculaire, ces CS Pax7+ quiescentes sont la principale source de progéniteurs myogéniques qui vont reconstituer le muscle endommagé (Fig 5) (Lepper et al., 2011). Dans ces conditions, les CS s'activent, puis expriment MyoD et prolifèrent, pour finalement s'engager vers la différenciation en exprimant MyoG et fusionner pour former de nouvelles fibres ou réparer les fibres endommagées. Une partie des cellules Pax7+/MyoD+ peuvent s'auto-renouveler, c'est à dire éteindre MyoD pour retourner en quiescence et aller reconstituer le pool de CS Pax7+ quiescentes (Fig 5) (pour revue Baghdadi and Tajbakhsh, 2018).

En plus de Pax7, qui est le marqueur principal des CS quiescentes adultes, d'autres marqueurs de surface ont également été décrits pour identifier les CS (pour revue (Yin et al., 2013), dont la M-Cadhérine (Irintchev et al., 1994), le CD34 et l' $\alpha 7$ -intégrine (Burkin and Kaufman, 1999; Gnocchi et al., 2009).



**Figure 5 : Schéma représentant le comportement des CS au cours de la myogénèse post natale et de la régénération du muscle adulte. D'après Tajbakhsh S et al., 2009.**

### 1.1.5.2. Les fonctions des CS dans l'homéostasie musculaire et l'exercice

A côté des processus de myogénèse post natale et de régénération où le rôle des CS est clairement démontré, l'implication de ces cellules dans l'homéostasie et la plasticité musculaire (atrophie/hypertrophie) est sujette à discussion (Tableau 1).

### **a) Conditions homéostatiques**

Des évènements de fusion ont été observés dans les muscles de souris à l'âge adulte, suggérant que les CS participent au maintien de l'homéostasie des fibres musculaires (Keefe et al., 2015). Cependant, le rôle des CS dans la maintenance des fibres musculaires en l'absence de stimulation apparaît être limité. En effet, plusieurs études montrent que la déplétion des CS ne conduit à aucune variation de l'aire des fibres musculaires et que le nombre de noyaux composant les fibres musculaires reste constant (Egner et al., 2016; Fry et al., 2014a, 2015, 2017; Keefe et al., 2015; Murach et al., 2017).

### **b) Exercice modéré**

Dans des conditions d'exercices physiques modérés (tapis de course ou course volontaire), le nombre de CS n'augmente pas entre les souris contrôles et les souris avec exercice suggérant que ce type d'exercice n'induit pas d'activation des CS (Jackson et al., 2015; Murach et al., 2017; Sambasivan et al., 2011). Néanmoins, dans les modèles murins déplétés en CS une altération des performances physiques (temps, vitesse et distance) est tout de même observée (Jackson et al., 2015). De plus, les changements phénotypiques des fibres musculaires induits par un protocole d'exercice modéré sur 8 semaines, ne sont pas dépendants de la présence ou non des CS (Jackson et al., 2015). Ces résultats ne semblent pas être muscles spécifiques puisque le diaphragme et le plantaris présentent les mêmes variations phénotypiques bien qu'ils soient caractérisés par des fonctions différentes (Murach et al., 2017).

### **c) Exercice intense et hypertrophie**

La course sur de longues distances ou les séries successives de contractions maximales induisent une activation des CS quiescentes qui fusionnent avec les fibres musculaires afin d'augmenter le volume de la fibre (Allen et al., 1999; Bellamy et al., 2014; Bruusgaard et al., 2010)(Crameri et al., 2004; Darr and Schultz, 1987; Dreyer et al., 2006).

L'hypertrophie peut également avoir lieu en l'absence d'activation des CS. En effet après induction de l'hypertrophie par ablation d'un muscle synergique, l'hypertrophie des fibres musculaires se fait indépendamment de la présence des CS pendant les 4 premières semaines (Fry et al., 2014a; McCarthy et al., 2011). Après cette période, l'hypertrophie n'est pas bloquée par l'absence de CS mais il apparaît que l'inclusion des nouveaux noyaux est nécessaire pour la croissance optimale de la fibre (Fry et al., 2014a).

Enfin, il apparaît que la nécessité des CS dans l'hypertrophie soit dépendante du type de fibre. En effet, les fibres lentes (MyHC type 1) semblent nécessiter l'incorporation de nouveaux noyaux pour s'hypertrophier contrairement aux fibres rapides (MyHC type IIa) (Fry et al., 2014b). La nécessité de l'incorporation de nouveaux noyaux et le maintien du domaine myonucléaire pourraient donc être liés aux caractéristiques métaboliques de la fibre (Murach et al., 2018; van Wessel et al., 2010).

### 1.1.5.3. Les liens entre les CS et la JNM

L'analyse des JNM par microscopie électronique montre une plus forte densité de noyaux dans la zone péri-synaptique présentant une localisation caractéristique des CS (entre la membrane de la fibre musculaire et la lame basale) chez l'homme et le rat (Cardasis and Padykula, 1981; Gibson and Schultz, 1982; Snow, 1983; Wokke et al., 1989). Ces résultats sont confirmés par l'observation en microscopie à fluorescence de fibres isolées montrant des CS (GFP+) co localisant avec les AchR à la JNM (Liu et al., 2017). Cependant, le pourcentage de JNM proches de CS varie entre 5 et 90% selon l'âge et la technique d'observation utilisée (Gibson and Schultz, 1982; Kelly, 1978; Liu et al., 2017). Egalement le nombre de CS localisées aux JNM tend à décliner avec l'âge (Tableau 1) (Liu et al., 2017).

Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer le rôle des CS sur la JNM. Tout d'abord, les CS seraient impliquées dans la maintenance des noyaux sous synaptiques et la synthèse des AchR en l'absence de stimulus de régénération ou d'hypertrophie (Liu et al., 2015; Wokke et al., 1989). De plus, les CS pourraient également être sensibles à l'activité électrique de la synapse via le récepteur de la dihydropyridine sensible au voltage. L'activation de ce récepteur par les ions K<sup>+</sup> relâchés par les fibres musculaires lors de la dépolarisation, induirait la cascade des IP<sub>3</sub> et l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> stimulant l'expression de gènes entrant dans le maintien de la JNM (Tableau 1) (Powell et al., 2003).

Lorsque les CS sont déplétées, les JNM commencent à dégénérer d'une façon identique à celle observée lors du vieillissement. Ce phénotype est observable seulement à partir de 7 mois après la perte de ces cellules. Les JNM présentent une diminution du nombre de noyaux post-synaptiques et une dégénérescence des compartiments post- et pré-synaptiques aboutissant à une JNM partiellement innervée (Tableau 1) (Liu et al., 2017).

Enfin, en cas de dénervation par section du nerf sciatique, les CS s'activent, prolifèrent et fusionnent sous la plaque motrice pour favoriser le processus de réinnervation du muscle. En revanche, dans un muscle déplété en CS, le nombre de JNM partiellement ou complètement dénervées augmente, conduisant à une atrophie des fibres musculaires et un changement phénotypique des fibres (Liu et al., 2015).

| Condition                               | Présence des CS  | Déplétion des CS   |
|---|--|--|
| Homéostasie                             | Fusion avec les fibres   | Aucune variation de l'aire des fibres  |
| Exercice modéré                         | Aucune augmentation du nombre des CS   | Diminution des performances (temps, vitesse et distance)<br>Aucun effet sur les changements de distribution des fibres induits par l'exercice                          |
| Exercice intense/hypertrophie           | Augmentation du nombre de noyau/fibre<br>Augmentation du volume de la fibre          | Pendant les 4 premières semaines : augmentation du volume de la fibre identique à celle observée lorsque les CS sont présentes, après ralentissement de la croissance. |
| Maintien des jonctions neuromusculaires | Localisation des CS à proximité des JNM et maintien du pool de noyau sous synaptique | Dégénération des JNM identique à celle observée lors du vieillissement conduisant à des jonctions partiellement innervées  |

**Tableau 1 : Rôle des CS dans l'homéostasie, l'exercice musculaire et la maintenance des JNM**

## 1.2. L'amyotrophie spinale

### 1.2.1. Définition et classification des différents types de SMA

L'amyotrophie spinale (Spinal Muscular Atrophy, SMA) est une pathologie caractérisée par une dégénérescence des motoneurons (MN) et par une atrophie musculaire entraînant une paralysie progressive pouvant aller jusqu'au décès du patient.

La SMA proximale, en référence à l'atteinte préférentielle des muscles proximaux (épaules, bras, hanches et cuisses), est la forme la plus fréquente. Elle est due dans 95% des cas à une délétion homozygote dans le gène *Survival of Motor Neuron1 (SMN1)* situé sur la partie télomérique du brin long du chromosome 5 (5q) (Lefebvre et al., 1995; Melki et al., 1990; Munsat et al., 1990; Rodrigues et al., 1995). Les 5% des cas restants sont causés par des mutations situées dans des régions très précises du gène (Alías et al., 2009; Parsons et al., 1998). La fréquence des porteurs de la délétion du gène *SMN1* est de l'ordre de 1/50 dans la population caucasienne (Ogino et al., 2002). Depuis les premières descriptions faites par les docteurs Werdnig et Hoffman dans les années 1890, plusieurs types de SMA ont été définis de 0 à IV en fonction des capacités motrices atteintes par les patients (capacités à s'asseoir, à se lever et à marcher) et de l'âge d'apparition des symptômes (Harding and Thomas, 1980; Hoffmann, 1893; Munsat and Davies, 1992; Werdnig, 1891). Cette classification qui était à l'origine bien délimitée entre les différents types, tend aujourd'hui à être considérée comme un spectre représentant les différentes formes de la maladie (Tableau 2, d'après Finkel et al., 2015; Kolb and Kissel, 2015; Monani, 2005). Avec une incidence d'un cas pour 6000 à 10000 naissances, la SMA est considérée comme une maladie rare. Cependant, l'âge d'apparition des symptômes et leur gravité, font de cette maladie la principale cause de mortalité infantile due à une maladie génétique.

De plus, il faut noter l'existence d'autres pathologies présentant les mêmes caractéristiques que la SMA liée à *SMN1*, mais étant causées par des mutations sur d'autres gènes (Karakaya et al., 2018; Peeters et al., 2014, Tableau 3 pour revue).

Cependant, la suite de ce manuscrit sera centrée uniquement sur la SMA causée par une mutation ou une délétion du gène *SMN1*.

### 1.2.2. Le diagnostic et suivi des patients

Le diagnostic de la SMA se fait dans un premier temps sur des signes cliniques sauf si d'autres cas ont été décrits dans l'histoire familiale. Les symptômes menant au diagnostic de la SMA chez le nouveau né sont : l'hypotonie, une faiblesse progressive et symétrique des muscles proximaux et des muscles respiratoires notamment des muscles intercostaux ce qui donne une forme de « cloche » au thorax (Mercuri et al., 2018). Une fois ces signes observés, un

| Type  | Âge d'apparition des symptômes | Signes cliniques  | Fonction motrice maximale atteinte  | Espérance de vie |
|---|--------------------------------|---|---|------------------|
| SMA proximale type 0                                      | Prénatal                       | Absence de mouvements (membres, face, tronc), besoin d'une ventilation mécanique                            | Aucune  | < 1 mois         |
| SMA proximale type I-A<br>Maladie de Werdnig-Hoffman      | 2 Premières semaines de la vie | Hypotonie sévère, faiblesse des membres et du cou, besoin d'aide à la nutrition, fasciculation de la langue | Aucune  | < 2 ans          |
| SMA proximale type I-B<br>Maladie de Werdnig-Hoffman      | Avant 3 mois                   | Hypotonie sévère, faiblesse des membres, thorax en forme de cloche, fasciculation de la langue              | Les patients ne se retournent et ne s'assoient pas seul                                 | < 2 ans          |
| SMA proximale type I-C<br>Maladie de Werdnig-Hoffman      | Entre 3 et 6 mois              | Hypotonie, faiblesse des membres, thorax en forme de cloche, fasciculation de la langue                     | Les patients ne se retournent et ne s'assoient pas seul                                 | < 2 ans          |
| SMA proximale type II                                     | Entre 6 et 18 mois             | Hypotonie modérée, faiblesse musculaire proximale > distale, membres inférieures > supérieures              | Les patients s'assoient, peuvent se mettre debout mais ne marche pas seuls              | > 2 ans          |
| SMA proximale type III-A<br>Maladie de Kugelberg-Welander | Entre 18 mois et 3 ans         | Plateau dans le développement moteur, réflexes réduits ou absents, perte de la marche durant la puberté     | Les patients marchent mais sont incapables de courir ou de sauter                       | Adulte           |
| SMA proximale type IIIb<br>Maladie de Kugelberg-Welander  | Plus de 3 ans                  | Perte modérée des fonctions motrices globales   | Les patients marchent, courent et sont capables de participer à des activités sportives | Adulte           |
| SMA proximale type IV                                     | Adolescence – âge adulte       | Difficulté avec les fonctions motrices globales   | Normale   | Adulte           |

**Tableau 2 : Classification des différents types de SMA.**

consensus international a mis en première intention le test génétique permettant d'identifier la délétion ou la mutation du gène *SMN1* et donc de confirmer la SMA proximale 5q (Wang et al., 2007). Les auteurs indiquent que la détermination du nombre de copies de *SMN2* n'est pas essentielle au diagnostic mais peut permettre la prédiction de la sévérité de la maladie et son évolution avec cependant des réserves dues aux gènes modificateurs (voir chapitre correspondant). Actuellement, les tests « gold standard » sont les qPCR et les séquençages de nouvelles générations. Pour les patients SMA-III, donc possédant un plus grand nombre de copies de *SMN2*, l'électromyogramme peut être également ajouté ainsi qu'une prise de sang

| Type   | Gène, localisation                  | Age d'apparition des symptômes | Symptômes   |
|--|-------------------------------------|--------------------------------|---|
| SMA distale  | 11q13                               | Entre 2 mois et 20 ans         | Faiblesse des muscles distaux et implication du diaphragme  |
| SMA distales avec détresse respiratoire (SMARD)                                | IGHMBP2; 11q13.2                    | Entre 1 et 6 mois              | Faiblesse des muscles distaux, implication du diaphragme et également des MN sensoriels et autonomes  |
| SMA infantile liée à X   | UBA1 ; Xp11.3-q11.2                 | A la naissance                 | Raideur de certaines articulations, insuffisance respiratoire, déformation du thorax et perte des cellules dans la corne antérieure   |
| SMA prédominante des membres inférieurs 1 (SMALED1)                            | DYNC1H1 ; 14q32.31                  | 3-4 ans                        | Faiblesse musculaire des membres inférieurs sans atteintes des membres supérieures  |
| SMA avec épilepsie myoclonique progressive                                     | ASAH1 ; 8p22                        | 2-5 ans                        | Difficultés à la marche, faiblesse des muscles proximaux, hypotonie, atrophie musculaire et patient réfractaire au traitement de l'épilepsie myoclonique  |
| SMA avec hypoplasie ponto cérébrale (PCH1B)                                    | VRK1 ; 14q32.2                      | Naissance                      | Défauts moteurs centraux et périphériques associés à une hypoplasie ponto cérébrale, micro encéphalie et retard mental  |
| SMA avec hypoplasie ponto cérébrale (PCH1B) SMA tardive de type Finkel (SMAFK) | EXOSC3 ; 9p13.2                     | Naissance                      | Défauts moteurs centraux et périphériques associés à une hypoplasie ponto cérébrale, micro encéphalie et retard mental<br>Faiblesse musculaire, perte des MN de la corne ventrale, crampes musculaires et fasciculation musculaires |
| SMA de type Jokela (SMAJ)  | –<br>22q11.2-q13.2                  | Adulte                         | crampes musculaires, fasciculation musculaires, affecte les muscles proximaux des membres inférieures et supérieures  |
| SMA adulte avec des défauts cardiaques (LGMD1B)                                | LMNA ; 1q22                         | <20 ans et entre 30-40 ans     | Faiblesse progressive des muscles proximaux, pathologie cardiaque, troubles neuromusculaires  |
| Amyotrophie spino-bulbaire (SBMA)  | Récepteur aux androgènes /Xq11.2-12 | Entre 30 et 50 ans             | Faiblesse des muscles proximaux, perte de MN et des neurones des ganglions des racines dorsales, implication bulbaire   |
| SMA distale IV   | 7p15 (autosomique dominant)         | Entre 12 et 36 ans             | Faiblesse des muscles distaux et faiblesse des mains  |
| SMA congénitale  | 12q23-24 (autosomique dominant)     | A la naissance                 | Raideur de certaines articulations, faiblesse non progressive des muscles distaux et affection des muscles de la ceinture et du tronc   |

**Tableau 3 : Formes de SMA non liées à SMN1.**

pour détecter le niveau sérique des Créatines PhosphoKinases permettant l'évaluation de l'état du muscle (Muqit et al., 2004). Une fois le diagnostic posé, le suivi des patients se fait par des tests adaptés selon leurs âges et leurs capacités motrices comme l'habilité à se mettre assis et la marche (Arnold et al., 2015; Bromberg and Swoboda, 2002).

L'évolution et le suivi de la santé des patients sont dépendants du type de SMA et de l'âge. Comme indiqué dans le tableau 1, les patients SMA-I sont incapables de s'asseoir. Les différents tests d'évaluation (Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders, CHOP INTEND) et d'électrophysiologie (Compound Muscle Action Potential-CMAP/Motor Unit Number Estimation-MUNE) indiquent la perte progressive de la mobilité et des unités motrices (Finkel et al., 2014). Ces patients nécessitent une ventilation (>16h/j, à partir de 13,5

mois pour 50% des patients et une aide à la nutrition. Pour les patients de type II, seule une faible proportion est capable de se mettre debout. L'apparition de faiblesses musculaires notamment dans la partie distale du bras survient dans les 5 premières années suivant l'apparition des symptômes (Zerres et al., 1997a). Les données d'électrophysiologie des patients SMA-II montrent également une diminution des valeurs du potentiel d'action musculaire (test CMAP) au cours des années (Farrar et al., 2013). Enfin, les patients SMA-III sont les seuls capables de se déplacer en marchant. La probabilité de la perte de la locomotion dépend du sous type (IIIa ou IIIb). Dix ans après le déclenchement des symptômes, 70% des patients SMA-IIIa et >90% des patients SMA-IIIb sont toujours capables de marcher. Ce pourcentage se réduit progressivement au cours du temps pour atteindre respectivement 20% et 60% pour les patients SMA-IIIa et IIIb 20 ans après l'apparition de la maladie. Enfin, à l'inverse des patients SMA-II, les patients SMA-III présentent à une corrélation positive (0,2) du CMAP (Farrar et al., 2013).

### **1.2.3. Les gènes *SMN1* et *SMN2***

#### **1.2.3.1. Le gène *SMN1***

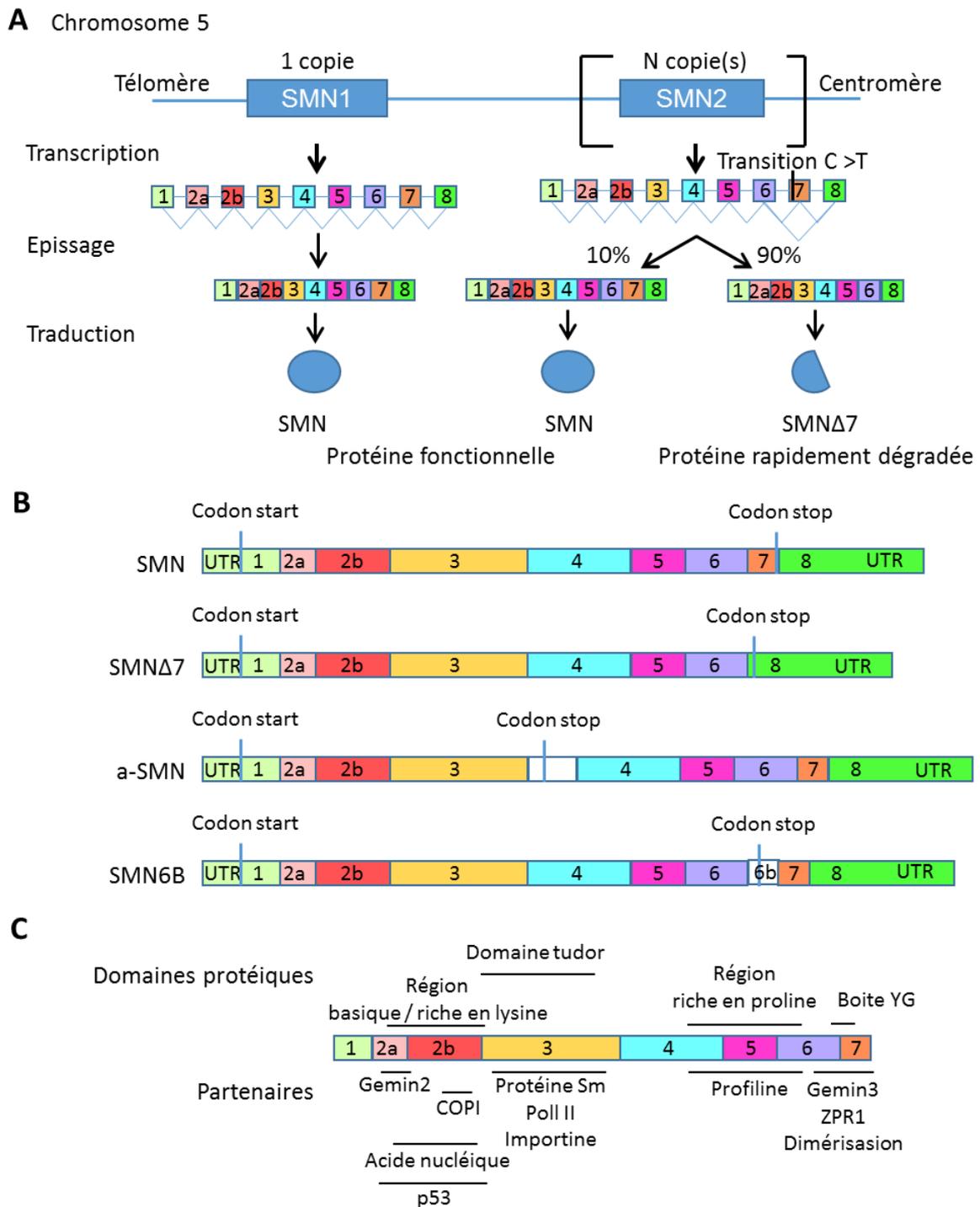
Le gène *SMN1* s'étend sur 29 kb dans la partie 5q du chromosome 5 (Fig 6A). Plusieurs éléments régulateurs ont été identifiés dans les 4,6kb en amont du site d'initiation de la transcription tels que : AP-1 et cAMP-Responsive Element (CRE) intervenant dans le cycle cellulaire, ainsi qu'une séquence de réponse aux interférons (Interferon Reponse Element, IRE) inductible par les interférons beta et gamma (Baron-Delage et al., 2000; Echaniz-Laguna et al., 1999). Des mécanismes de régulation épigénétiques de l'expression de *SMN1* ont également été rapportés tels que l'acétylation des histones chez la souris et dans des fibroblastes isolés de patients (Kernochan et al., 2005).

Enfin dans le génome humain, le site d'initiation de la transcription de *SMN1* est dépendant de l'âge : durant le développement embryonnaire le site est situé à 242 pb du site d'initiation de la traduction, alors qu'à l'âge adulte le site utilisé est à 163 pb (Echaniz-Laguna et al., 1999; Germain-Desprez et al., 2001).

#### **1.2.3.2. Le gène *SMN2***

Dans le génome humain, une duplication de la région comprenant le gène *SMN1* a été identifiée sur la partie centromérique du chromosome 5 (Fig 6A, Lefebvre et al., 1995). Cette région comprend le gène *SMN2* et des éléments régulateurs qui sont identiques à *SMN1*. L'apparition de ce gène s'est faite en 2 temps : la version télomérique du gène *SMN* a été copiée et transposée avant la séparation des lignages entre *Homo Sapiens* et *Pan troglodytes* donc il y a, au moins, 5 millions d'années et le gène *SMN2* est ensuite apparu uniquement chez les humains (Courseaux et al., 2003; Rochette et al., 2001).

La séquence de *SMN2* est identique à *SMN1*, y compris la région du promoteur, à l'exception de 5 nucléotides dont une transition d'une cytosine en thymine localisée au début



**Figure 6 : Schéma des gènes *SMN1* et *SMN2*, de leurs transcrits et de la protéine SMN. (A) Organisation et expression des gènes *SMN1* et *SMN2* sur le chromosome 5 (B) ARNm transcrits à partir des gènes *SMN1* et *SMN2* (C) Répartition des domaines et des partenaires protéiques sur la forme complète de la protéine SMN. Adapté de Singh et al., 2017.**

de l'exon 7 (Bürglen et al., 1996a). Cette transition empêche le recrutement de facteurs impliqués dans l'épissage conduisant à l'exclusion de l'exon 7 dans 90% des ARNm (Lorson et al., 1999). Dans ce cas, l'ARNm tronqué produit est appelé *SMNDelta7* (ou *SMNΔ7*). L'exon 8 contient alors la séquence codant pour un motif protéique EMLA reconnu comme un signal de dégradation diminuant la stabilité de la protéine *SMNΔ7* produite et le codon stop (Cho

and Dreyfuss, 2010). Cependant, dans 10% des cas, le gène *SMN2* peut être transcrit en un ARNm complet et par conséquent produire une protéine SMN fonctionnelle (Fig 6A)

L'absence complète de SMN est létale très tôt au cours du développement embryonnaire avant le stade de la gastrulation (Monani et al., 2000; Schrank et al., 1997).

Au cours de la SMA, le gène *SMN1* étant muté, seul le gène *SMN2* peut maintenir partiellement la production de protéine SMN. La SMA est donc causée par une diminution de la quantité de protéine SMN. Enfin, ce gène peut être présent en un nombre variable de copies dans le génome humain, et le nombre de copies de *SMN2* conditionne le degré de sévérité de la pathologie : 2 copies pour 70% des patients SMA I, 3 copies pour 82% des patients SMA II et 3-4 copies au minimum pour les patients SMA III (Fig 6A) (Feldkötter et al., 2002; Wirth et al., 2006).

### **1.2.3.3. La régulation de l'expression des gènes SMN**

Le niveau d'expression des gènes SMN varie de manière similaire durant les phases de développement embryonnaire, post natale et à l'âge adulte (Bella et al., 1998; Burlet et al., 1998; Kernochan et al., 2005; Novelli et al., 1997).

Le promoteur du gène *SMN1* semble être fortement actif durant le développement embryonnaire (Novelli et al., 1997). Une diminution comprise entre 40 et 60% de l'expression de *SMN* a été observée par qPCR entre le développement embryonnaire au stade E15 de la souris et à l'âge adulte dans le cerveau, la moelle épinière, le rein et le foie (Kernochan et al., 2005). Des observations semblables ont été faites chez l'homme au niveau de la moelle épinière (71%), du muscle (35%) et des reins (65%) (Soler-Botija et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés par western blot montrant une diminution de l'expression de SMN dans le cerveau, la moelle épinière (90-70%), le foie (90%), les poumons (90%), les muscles (50%) et les reins (50%) chez les rongeurs et les humains (Bella et al., 1998; Burlet et al., 1998; Kernochan et al., 2005). A l'âge adulte, le niveau de la protéine SMN est variable : élevé dans le foie, les reins, les testicules et la moelle épinière, modéré dans les muscles cardiaques et squelettiques et faible dans les fibroblastes et les lymphocytes (Burlet et al., 1998; Coover et al., 1997; Ottesen et al., 2016). De façon intéressante, une étude a démontré que le promoteur des gènes SMN est plus actif dans les cellules neuronales non différenciées *in vitro* (Germain-Desprez et al., 2001).

### **1.2.3.4. Les transcrits alternatifs de *SMN1***

L'épissage alternatif du gène *SMN1* peut donner trois autres transcrits. Le premier est appelé axonal SMN (a-SMN) et provient de la rétention de l'intron 3 ce qui introduit un codon stop prématuré. Ce transcrit est retrouvé dans les motoneurons et en particulier dans les axones où la protéine a-SMN interviendrait dans l'axogénèse. En revanche, l'a-SMN n'est pas détectée à l'âge adulte (Setola et al., 2007). Le second transcrit est obtenu par la prise en compte comme un exon d'une séquence Alu-like de l'intron 6 qui insère également un codon

stop prématuré (Seo et al., 2016). Son apparition est favorisée par des conditions de stress et ce transcrit est un substrat de la voie de dégradation non-sens (Non sense Mediated Decay, NMD). Un troisième transcrit alternatif de *SMN1* a été identifié chez des patients SMA et des individus sains. Il est généré par l'exclusion des exons 5 et 7 mais sans qu'une isoforme de la protéine ne soit décrite (Fig 6B) (Gennarelli et al., 1995).

### 1.2.3.5. La protéine SMN

La protéine SMN est exprimée de manière ubiquitaire. La séquence codant la protéine SMN est répartie sur les exons 1 à 7 (le 8<sup>ème</sup> ne contient que la séquence 3' UTR) et donne après traduction une structure primaire de 294 acides aminés (AA) pour une masse molaire de 32 kDa. En 2015, une structure 3D par cristallographie a été proposée mais a dû être retirée du fait d'erreurs d'interprétations (Seng et al., 2015, 2016). Plusieurs travaux ont néanmoins permis de décrire les différents domaines composant SMN et leurs fonctions (pour revue Singh et al., 2017). A partir de l'extrémité N terminale se trouve une première région riche en AA basiques (chargés positivement à pH 7.4) / AA lysine offrant donc des possibilités d'interactions électrostatiques. Dans la continuité de ce domaine protéique, SMN possède un domaine Tudor permettant l'interaction avec des protéine diméthylées sur des motifs Arginine-Glycine-Glycine / Arginine-Glycine (Brahms et al., 2001; Mohaghegh et al., 1999; Tripsianes et al., 2011). Enfin, la dernière partie de la protéine est composée par : une région riche en proline et un domaine de 16 AA contenant la boîte tyrosine-glycine (YG box) à l'extrémité C terminale. Ce dernier domaine est codé par l'exon 7 du gène *SMN* et est donc absent dans les ARNm *SMN $\Delta$ 7* provenant du gène *SMN2*. Cette région permet la dimérisation des protéines SMN, assure la stabilité et régule les localisations cellulaires notamment via un motif d'AA QNQKE (Fig 6BC) (Cho and Dreyfuss, 2010; Lorson et al., 1998; Zhang et al., 2007).

Des modifications post traductionnelles de la protéine SMN ont été décrites et contribuent à réguler ses différentes fonctions décrites ultérieurement.

Tout d'abord, des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation par la protéine kinase A et la sérine thréonine phosphatase 4 (PPP4), ont été décrits au niveau des sérines 4, 5, 8, 187 et de la thréonine 185 respectivement (Burnett et al., 2009a; Grimmler et al., 2005; Wu et al., 2011). Ces modifications participent à la stabilité de la protéine et à la régulation de certaines de ses fonctions cellulaires comme la maturation des petits ARN nucléolaires (snARN).

Les fonctions et la localisation cellulaire de SMN peuvent également être régulées par ubiquitination. Ainsi, la mono ubiquitination de SMN par Itch, induit sa relocalisation nucléaire tout en bloquant son interaction avec les protéines Sm intervenant dans la maturation des snARN (Han et al., 2016).

D'autre part, la protéine SMN et la protéine tronquée *SMN $\Delta$ 7* peuvent être poly-ubiquitinées par le complexe du protéasome (Burnett et al., 2009b). Cependant, les cinétiques

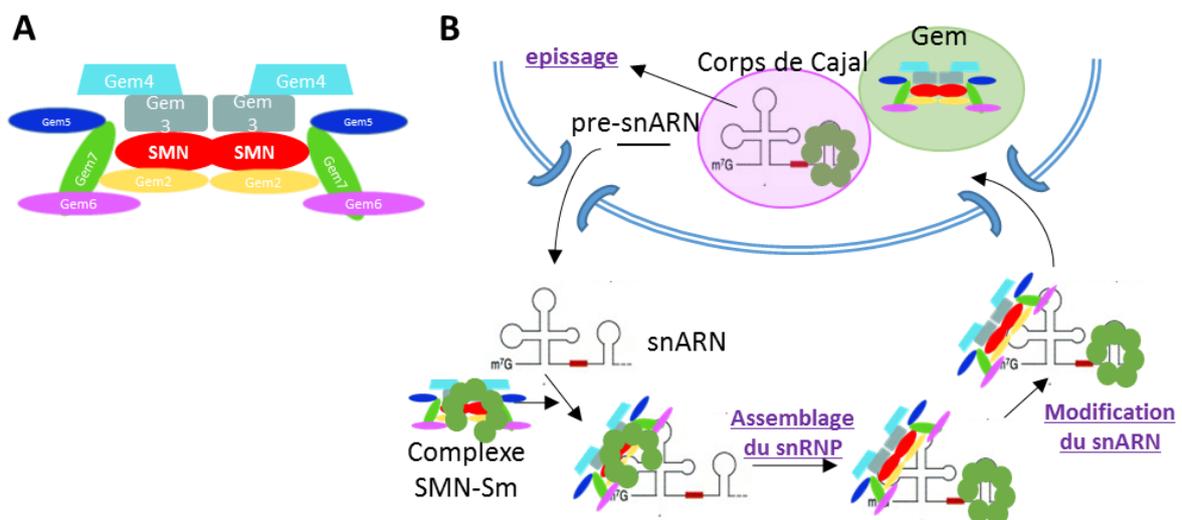
de dégradation différent entre la forme complète et tronquée : le temps de demi-vie est de 4,35h pour SMN et 2,15h pour SMNDelta7. D'après les auteurs de l'étude, la capacité de SMN à former des dimères dans sa forme complète pourrait également expliquer sa plus grande stabilité.

#### 1.2.4. Les fonctions de la protéine SMN

Bien que SMN soit exprimée de manière ubiquitaire, les travaux de recherche se sont longtemps attachés à identifier sa fonction dans les motoneurones (MN) afin de comprendre les mécanismes conduisant à une dégénérescence sélective de ces cellules.

Les différents domaines constituant SMN (Fig 6C) lui permettent d'interagir avec différents partenaires lui conférant ainsi différentes fonctions dont les principales sont évoquées ci-dessous.

##### 1.2.4.1. Rôle dans le métabolisme des ARN



**Figure 7 : La maturation des snARN. (A) Le complexe SMN. (B) Etapes de la maturation des snARN par le complexe SMN. Adapté de Yong et al. 2010.**

La première, et par conséquent la mieux décrite des fonctions de SMN est sa participation à la maturation des snARNs (pour *small nucleolar RNA*, petit ARN nucléolaire) U1, U2, U4, U5, U6, U11 et U12. Dans le cytoplasme, SMN sous forme dimérique, interagit avec les protéines Gemin (2-3-4-5-6-7-8) et UNRIP pour former le complexe SMN (Fig 7A) (pour revue : Battle et al., 2006; Burghes and Beattie, 2009; Cauchi, 2010). Dans un second temps, ce complexe se lie aux protéines Sm (B, B', D1, D2, D3, E, F et G) et aux snARNs grâce à une séquence spécifique (5'-AUUU/CUUG-3') suivie par un motif tige boucle (Fig 7B). Après une série de méthylation et un raccourcissement de l'extrémité 3' des snARNs, le complexe ribonucléoprotéique est importé dans le noyau. Le snRNP se sépare alors du complexe SMN puis est dirigé vers le corps de Cajal où il subit ses dernières maturations avant de pouvoir intervenir dans l'épissage des

pre-ARNm. Le complexe SMN est lui dirigé dans une structure adjacente appelée Gems (Fig 7B). Enfin, dans les MN et plus particulièrement au niveau des synapses et des axones, SMN forme des complexes dynamiques avec les protéines Gemins mais très peu avec les protéines Sm laissant supposer d'autres fonctions du complexe SMN-Gemins (Zhang et al., 2006).

Dans le cas de la SMA, le déficit en SMN conduit à des défauts de maturation des snARN qui sont variables selon les tissus et les snRNA eux-mêmes (Wan et al., 2005; Zhang et al., 2008). De ce fait, des défauts d'épissage sont décrits tels que la rétention des introns mineurs causés par l'absence du snARN U12 (Fox-Walsh and Hertel, 2009; Lotti et al., 2012; Zhang et al., 2008).

Ces défauts de maturation des snARN pourraient être une des causes de la mort des MN. En effet, des études ont montré la perturbation de l'épissage de plusieurs gènes essentiels à la survie des MN tels que *Stasimon*, *Mdm2* et *Mdm4* (Lotti et al., 2012; Van Alstyne et al., 2018). Dans le cas de *Mdm2* et *4*, les défauts d'épissages de ces gènes entraînent directement l'augmentation de l'expression de p53 qui sous-tend le processus neurodégénératif dans la SMA comme nous le verrons dans la partie sur l'apoptose.

Des études ont également montré que ce mécanisme est dérégulé dans d'autres cellules d'un modèle murin sévère comme : le cerveau, le cœur, les reins et le muscle squelettique (Zhang et al., 2008, 2013).

Cependant, le lien entre la perturbation de la biogenèse des snARN dans la SMA et les phénotypes observés au niveau des cellules est sujet à débat. Dans le modèle SMA sévère Delta7, la dérégulation de l'épissage des ARN est distinguable 13 jours après la naissance et est donc postérieure à l'apparition des symptômes (Bäumer et al., 2009). La dérégulation de l'épissage des ARN ne serait donc pas suffisante pour expliquer les effets de la perte de SMN sur la survie des MN.

Le second rôle décrit de SMN dans le métabolisme des ARN, est l'acheminement de l'ARNm de la  $\beta$ -actine le long de l'axone permettant notamment la croissance axonale d'après des données *in vitro* (Rossoll et al., 2002, 2003). Cette fonction est permise par l'interaction entre l'extrémité C-terminale de SMN et un autre partenaire : hnRNP R. Cette protéine permet l'interaction avec une séquence zip code présente sur la région 3' de l'ARNm de la  $\beta$ -actine.

Enfin, d'autres fonctions sont décrites pour SMN dans le métabolisme des ARN comme : la terminaison de la transcription et la formation des granules de stress (pour revue Singh et al., 2017). SMN pourrait également former plusieurs interactions avec les protéines impliquées dans la voie de maturation des miARN qui seront décrites dans la partie correspondante.

#### **1.2.4.2. Rôle de SMN dans les processus apoptotiques**

Un ensemble de données montrent que le déficit en SMN induit la mort des cellules par apoptose. Tout d'abord, *in vivo*, le KO complet de SMN entraîne l'apoptose massive des

cellules avant la gastrulation chez souris (Schrank et al., 1997). Lorsque SMN est réduite, des marques associées à l'apoptose sont retrouvées dans plusieurs types cellulaires : les MN de patients SMA très sévères durant la période de gestation et après la naissance (Simic et al., 2000; Soler-Botija et al., 2002), dans les muscles de patients SMA-I (Tews and Goebel, 1996), ainsi que dans les fibres musculaires et les cellules satellites de souris sévères SMA (Dachs et al., 2011).

En accord avec ces observations *in vivo*, plusieurs mécanismes d'induction de l'apoptose liés au déficit en SMN ont été proposés dans la littérature.

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les défauts d'épissages de certains gènes entraînent l'apoptose des MN via p53. De plus, d'après des données *in vitro*, la protéine SMN peut interagir directement avec une protéine anti-apoptotique : Bcl2 (Iwahashi et al., 1997; Sato et al., 2000). L'interaction de ces 2 protéines inhibe l'activation de Bax, une protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl2, bloquant ainsi l'apoptose. SMN interagit également avec p53 *in vitro* bloquant ainsi la transcription de *Bax* via p53 (Miyashita and Reed, 1995; Young et al., 2002). De façon intéressante, le KO de *bcl-2* chez la souris entraîne un phénotype proche de celui de la SMA avec la perte des MN et à l'inverse le KO de *Bax* dans un modèle SMA modérées (souris taiwanaises) atténue le phénotype des souris (Michaelidis et al., 1996; Tsai et al., 2006). Ensemble, ces études confirment donc le rôle du complexe SMN-Bcl2 comme un des mécanismes de protection contre l'apoptose médiée par Bax dans les MN qui est perdu avec la réduction de SMN.

Enfin, SMN pourrait également prévenir l'activation de la voie des caspases sans qu'un lien direct caspase/SMN ne soit mis en avant par les auteurs (Vyas et al., 2002).

#### **1.2.4.3. Rôle de SMN dans la dynamique du cytosquelette d'actine**

Grâce à son domaine riche en proline, SMN interagit avec la profilin 2a (p2a) qui est impliquée dans la régulation de la dynamique de l'actine et la neurogenèse (Bowerman et al., 2007; Giesemann et al., 1999; Nölle et al., 2011; Sharma et al., 2005). Cette interaction empêcherait l'hyper-phosphorylation de p2a par ROCK et maintiendrait la dynamique de l'actine normale permettant la croissance correcte des cônes de croissance des MN *in vitro*.

#### **1.2.4.4. Rôle de SMN dans le trafic vésiculaire**

La sous-unité  $\alpha$ -COP des vésicules COPI est capable de se lier directement à SMN grâce à un motif di-lysine présent sur SMN et codé par l'exon 2b (Custer et al., 2013; Peter et al., 2011). Ce complexe est impliqué dans le transport entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, le système sécréteur de la cellule et le tri des protéines membranaires et solubles (Beck et al., 2009). Des données obtenues sur des modèles de poisson zèbre et sur des cellules neuronales immortalisées NSC-34 suggèrent l'importance de ce complexe dans la

croissance de l'axone au cours du développement embryonnaire (Li et al., 2015). La réduction de SMN entrainerait donc la dérégulation de ce processus via COPI.

A côté de ce premier rôle dans le système endomembranaire, SMN intervient également dans la régulation des processus d'endocytose et d'autophagie. En effet, la protéine SMN se lie avec la calvéoline, une protéine impliquée dans les processus d'endocytose (Doherty and McMahon, 2009; Pelkmans and Helenius, 2002). Chez *C.elegans*, le KO de SMN conduit à la perte du recyclage des vésicules au niveau de la membrane synaptique. De même, dans le modèle murin taiwanais, l'endocytose est perturbée après stimulation musculaire (Dimitriadi et al., 2016; Hosseinibarkooie et al., 2016). Pour l'autophagie, aucun lien protéique direct n'est constaté avec SMN. Cependant une protéine retrouvée dans la membrane des auto phagosomes (LC3II) est augmentée dans les cultures de MN embryonnaires où SMN est réduite ce qui est corrélé à l'augmentation des phagosomes (Garcera et al., 2013). Ce phénotype est observable *in vivo* dans les moelles épinières des souris du modèle SMA intermédiaire (le modèle taiwanais) (Periyakaruppiyah et al., 2016). Enfin, la fusion entre les auto-phagosomes et les lysosomes est perturbée dans des cellules neuronales immortalisées NCS34 KO pour *Smn* (Custer and Androphy, 2014).

#### **1.2.4.5. Rôle de SMN dans la voie de l'ubiquitine**

L'ubiquitination est un mécanisme conduisant à l'ajout post-traductionnel d'ubiquitines sur les protéines, soit pour agir comme voie de signalisation (mono-ubiquitination, ex : l'ubiquitination de SMN relocalise la protéine dans le noyau, Han et al., 2016), soit pour diriger les protéines vers le protéasome pour être dégradées (cas des protéines poly-ubiquitinilées, pour revue Komander and Rape, 2012). D'après une analyse protéique, SMN interagit avec plusieurs protéines de la voie de l'ubiquitination dont UBA1 et plusieurs ligases (Wishart et al., 2014). Les souris du modèle SMA très sévère (hSMN2) ont un taux réduit de UBA1 et l'absence de cette protéine est responsable du déclenchement de la SMA liée au chromosome X (Baumbach-Reardon et al., 2012; Wishart et al., 2014). A l'inverse, la restauration de UBA1 dans différents modèles SMA réduit le phénotype suggérant l'implication de cette protéine dans la physiopathologie de la SMA (Powis et al., 2016).

#### **1.2.4.6. Liens entre SMN, la réparation de l'ADN et les processus épigénétiques**

Tout d'abord, SMN et Gemin 2 interagissent avec la protéine RAD5 qui est impliquée dans la recombinaison homologue des brins d'ADN durant la méiose (Takaku et al., 2011; Takizawa et al., 2010). SMN est également recrutée lors de dommages de l'ADN au niveau des centromères (Morency et al., 2007). En parallèle, les dommages sur l'ADN sont augmentés dans différents modèles SMA au niveau du muscle et des cellules testiculaires (Fayzullina and Martin, 2014; Ottesen et al., 2016). Cependant la fonction exacte de SMN dans la réparation

de l'ADN est inconnue. Enfin, les domaines tudors de SMN permettent son interaction avec la lysine 79 de l'histone 4 lorsque que cet acide aminé est méthylé (Sabra et al., 2013). Ici aussi, l'influence de SMN dans les processus épigénétiques est inconnue.

#### **1.2.4.7. Les gènes modificateurs**

Chez la plupart des patients, le niveau de la protéine SMN, qui dépend du nombre de copies du gène *SMN2*, détermine l'âge d'apparition et la sévérité des symptômes. Cependant, dans certains cas, le nombre de copies du gène *SMN2* ne correspond pas au phénotype observé en raison de gènes modificateurs qui peuvent moduler la gravité de la maladie (Harada et al., 2002). Par exemple, des études ont montré que 50% des patients SMA de type I portent une délétion du gène *NAIP* situé en aval de *SMN1* (Roy et al., 1995). L'inactivation de ce gène semble être un facteur défavorable puisque certains patients présentent une SMA de type I malgré la présence de 3 copies de *SMN2* (Harada et al., 2002; Watihayati et al., 2009). Chez les patients SMA de type II et III le pourcentage d'individus porteurs de cette délétion est comprise entre 20 et 10% (Zerres et al., 1997b).

A l'inverse, des gènes protecteurs ont été identifiés. En effet, une atténuation des symptômes a été décrite chez certains patients ayant une mutation du gène *SMN1* mais une expression élevée du gène *plastin3* potentiellement due d'après les auteurs à des mutations sur les éléments régulateurs du gène (Oprea et al., 2008).

#### **1.2.5. Les modèles animaux**

Plusieurs modèles animaux ont été créés pour pouvoir comprendre la maladie et mettre au point des traitements.

##### **1.2.5.1. Les modèles murins (Tableau 4)**

###### **a) Modèles murins très sévères de SMA type Ia :**

Les premiers modèles murins de SMA ont pu être développés suite à l'identification du gène murin *Smn*, homologue du gène humain *SMN1* et situé sur le chromosome 13 (DiDonato et al., 1997; Viollet et al., 1997). Comme décrit précédemment, le gène *SMN2* est retrouvé uniquement dans le génome humain (Rochette et al., 2001). L'absence totale de SMN étant létale à un stade très précoce du développement embryonnaire (Schrank et al., 1997), le premier modèle murin de SMA a été développé en invalidant le gène *Smn* endogène murin et en ajoutant un transgène humain *hSMN2* (*Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sup>tg/tg</sup>) (Monani et al., 2000). Ce modèle, appelé hSMN2, est utilisé comme modèle de SMA de type I et reproduit les caractéristiques de la pathologie telles que la perte des motoneurones, l'atrophie musculaire et une durée de vie réduite. A la naissance, les souris *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sup>tg/tg</sup> sont similaires aux souris contrôles de la même portée bien que certaines soient déjà légèrement plus petites. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent 48h après la naissance avec une dégradation rapide de

| Sévérité du modèle, type de SMA | Génotype  | Survie moyenne              | Référence               |
|---------------------------------|---|-----------------------------|-------------------------|
| NA                              | <i>Smn</i> <sup>-/-</sup>   | Létal durant l'embryogénèse | (Schrank et al., 1997)  |
| Très sévère, SMA 0-Ia           | <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> (89Ahmb) <sup>+/+</sup>                                 | 5 jours                     | (Monani et al., 2000)   |
|                                 | <i>Smn1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN1</i> (VDQNQKE); <i>SMN2</i> <sup>tg/tg</sup>                | 6,5 jours                   | (Workman et al., 2009)  |
| Sévère, SMA Ib-II               | <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> (2Hung) <sup>+/+</sup>                                  | 10 jours                    | (Hsieh-Li et al., 2000) |
|                                 | <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> <sup>+/+</sup> ; <i>SMN1</i> (A111G) <sup>+/-</sup>     | 8,2 jours                   | (Workman et al., 2009)  |
|                                 | <i>Smn1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> <sup>tg/tg</sup> ; <i>SMNΔ7</i> <sup>tg/tg</sup>       | 13 jours                    | (Le et al., 2005)       |
|                                 | <i>Smn</i> <sup>+/-</sup> ; <i>SMN2</i> (N11) <sup>+/-</sup> ; <i>SMN2</i> (N46) <sup>+/-</sup> | 15 jours                    | (Michaud et al., 2010)  |
| Modéré, SMA II                  | <i>Smn</i> <sup>2B/-</sup>  | 28 jours                    | (Bowerman et al., 2009) |
| Modéré, SMA II-III              | <i>Smn1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> <sup>tg/tg</sup> ; <i>SMN1A2G</i>                      | 227 jours                   | (Monani et al., 2003)   |
|                                 | <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> (2Hung) <sup>+/+</sup>                                  | Adulte                      | (Hsieh-Li et al., 2000) |
|                                 | <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> <sup>+/+</sup> ; <i>SMN1</i> (A111G) <sup>+/-</sup>     |                             | (Workman et al., 2009)  |
|                                 | <i>Smn1</i> <sup>tm5(Smn1/SMN2)Mrph</sup>   |                             | (Osborne et al., 2012)  |
|                                 | <i>Smn</i> <sup>+/-</sup> ; <i>Gemin2</i> <sup>+/-</sup>  |                             | (Jablonka et al., 2002) |
|                                 | <i>Smn</i> <sup>+/-</sup>   |                             | (Jablonka et al., 2000) |

**Tableau 4 : modèles murins SMA.**

l'état de santé de la souris dans les jours suivants et une mort prématurée au maximum 6 jours après la naissance. Un second modèle murin sévère a été créé à partir d'une mutation retrouvée sur le gène *SMN1* chez certains patients SMA. Pour cela, le gène *Smn* endogène a été invalidé et 2 transgènes ont été ajoutés : le premier transgène correspond aux exons 1 à 6 et à une partie de l'exon 7 codant uniquement pour les acides aminés VDQNQKE du gène *SMN1* et le second transgène au gène *SMN2* (*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN1*(VDQNQKE); *SMN2*<sup>tg/tg</sup>) (Workman et al., 2009). Ces souris présentent une espérance de vie de l'ordre de 6,5 jours.

#### **b) Modèles murins sévères de SMA type Ib et II :**

A partir de ces 2 modèles murins très sévères, d'autres modèles moins sévères ont été développés afin de mimer la sévérité des symptômes observés chez les patients atteints de SMA de type Ib et II. Le modèle de souris « taiwanaises » qui portent une mutation particulière sur le gène *Smn* le rendant non fonctionnel et un transgène comprenant les gènes *SMN2*, *SERF1* et une partie de *NAIP* (*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*(2Hung)<sup>tg/tg</sup>) (Hsieh-Li et al., 2000). L'espérance de vie de ces souris est de deux semaines environ avec l'apparition des symptômes entre 4-5 jours après la naissance. Un second modèle appelé le modèle Δ7, présente un phénotype similaire et a été créé en rajoutant un transgène *SMNΔ7* aux souris hSMN2

(*Smn1*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sup>tg/tg</sup>;*SMNΔ7*<sup>tg/tg</sup>) (Le et al., 2005). Egalement, comme cela a été fait pour le modèle de SMA très sévère (*SMN1*(VDQNNQKE); *SMN2*<sup>tg/tg</sup>), un troisième modèle sévère de la maladie a été créé en ajoutant 2 transgènes : un gène *SMN1* porteur d'une mutation A111G retrouvée dans certains cas de SMA Ib/II et le gène *SMN2* (*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*<sup>tg/tg</sup>;*SMN1*(A111G)<sup>tg/+</sup>) (Sun et al., 2005; Workman et al., 2009). Un quatrième modèle de SMA sévère (type II) a été obtenu en croisant des animaux hétérozygotes pour le gène *Smn* et porteurs dans leur génome soit de deux copies de *hSMN2* soit de 4 copies leur permettant d'avoir une survie médiane de 15 jours (*Smn*<sup>+/-</sup>; *SMN2*(N11)<sup>+/-</sup>; *SMN2*(N46)<sup>+/-</sup>) (Michaud et al., 2010). Enfin un dernier modèle proche des formes intermédiaires de la maladie a été obtenu en réalisant une substitution de 3 nucléotides de l'élément favorisant l'épissage situé au début de l'exon 7 (*Smn*<sup>2B/-</sup>) (Bowerman et al., 2009). Ces souris ont une survie de 28 jours.

### c) Modèles murins de SMA type II et III :

Des modèles caractérisés par des symptômes moins sévères proches des caractéristiques des patients SMA de type II/III ont été également développés. Bien que des atteintes neuromusculaires soient détectables, le phénotype des animaux est peu sévère leur permettant d'atteindre l'âge adulte et d'avoir une survie normale. Le premier modèle provient des souris *Smn*<sup>+/-</sup> initialement générées par B.Schrank pour obtenir les animaux *Smn*<sup>-/-</sup> (Schrank et al., 1997). Ces animaux ont une réduction de 50% de la protéine SMN conduisant à une diminution de 50% du nombre de MN 12 mois après la naissance sans qu'une diminution de la force musculaire ne soit observée grâce à un processus de dénervation-réinnervation des fibres musculaires (Balabanian et al., 2007; Jablonka et al., 2000; Udina et al., 2017). Un phénotype légèrement plus sévère que celui des souris *Smn*<sup>+/-</sup> a également été créé en invalidant le gène *Gemin2* (*Smn*<sup>+/-</sup>; *Gemin2*<sup>+/-</sup>, Jablonka et al., 2002). Un troisième modèle a été obtenu en remplaçant le transgène *SMNΔ7* par un transgène *SMN1* contenant une mutation A2G (Souris A2G, *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sup>tg/tg</sup>;*SMN1A2G*) (Monani et al., 2003). Un quatrième modèle est obtenu par l'ajout des exons humains *hSMN2* 7-8 aux exons 1-6 du gène *Smn* murin ainsi que l'ajout d'un transgène *hSMN2* aboutit également à un phénotype peu sévère (souris *Smn*<sup>C/C</sup>, *Smn1*<sup>tm5(Smn1/SMN2)Mrph</sup>, Osborne et al., 2012). Enfin une lignée *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sup>+/+</sup>;*SMN1*(A111G)<sup>+/-</sup> a une survie augmentée du fait d'un nombre de copies du transgène plus important que la lignée sévère.

### d) Modèles murins conditionnels de SMA:

Enfin, plusieurs modèles ont été créés pour permettre d'étudier l'absence de SMN restreinte à des tissus particuliers. L'obtention de ces modèles a été rendue possible par l'ajout de séquences de recombinaison F7 autour de l'exon 7 du gène *Smn* (Frugier et al., 2000). Ces animaux peuvent ensuite être croisés avec d'autres modèles murins exprimant une enzyme de recombinaison Cre régulée par un promoteur tissu spécifique et éventuellement

inductible par l'administration de tamoxifène. Les phénotypes des différents modèles obtenus seront décrits dans la partie concernant les phénotypes tissulaires observés dans la SMA.

#### **1.2.5.2. Les gros mammifères**

Le développement clinique de traitements pour la SMA nécessite le passage sur de plus gros animaux afin de confirmer l'efficacité, la non toxicité et la faisabilité des thérapies développées. Dans le cas de la SMA, plusieurs modèles sont utilisés comme le porc (Doktor et al., 2014; Duque et al., 2015).

#### **1.2.5.3. Les autres modèles *in vivo***

Afin de faciliter l'étude de certains phénomènes et mécanismes moléculaires d'autres modèles ont été créés à partir d'organismes phylogénétiquement moins évolués. Un modèle largement utilisé dans cette optique est la drosophile. Plusieurs modèles ont été générés en invalidant le gène *dSmn* par un ARN double brin (dsARN) (Rajendra et al., 2007), en utilisant un système inductible (Miguel-Aliaga et al., 1999) ou en générant des mutations ponctuelles sur le gène *dSmn* (Chan et al., 2003). Des poissons zèbres et des xénopes ont également été générés en utilisant des morpholinos ou des siARN dirigés contre le gène *Smn* (See et al., 2014; Winkler et al., 2005; Ymlahi-Ouazzani et al., 2010) ou en créant des lignées transgéniques exprimant différents niveaux de *Smn* (Hao et al., 2013). Enfin, un modèle de *C.elegans* induit par la technologie des siARN a également été décrit (Miguel-Aliaga et al., 1999).

### **1.2.6. Les traitements de la SMA**

Jusqu'à très récemment, les seuls traitements disponibles permettaient uniquement de limiter les symptômes de la maladie, en préservant les fonctions respiratoires (kinésithérapie, vaccin anti grippe, éventuellement la ventilation et l'arthrodèse), le système gastro-intestinal (sonde gastrique, chirurgie) et en adaptant l'environnement du patient. Ces différents traitements sont adaptés en fonction du type et de l'avancée de la maladie (Farrar et al., 2017; Wang et al., 2007). Cependant, ces 5 dernières années, des avancées considérables ont été réalisées pour le traitement de la SMA conduisant aux premiers succès thérapeutiques.

#### **1.2.6.1. Les traitements SMN-dépendants**

La SMA étant une maladie monogénique, de nombreuses équipes ont travaillé à l'élaboration de stratégies thérapeutiques permettant de restaurer le niveau de SMN, en particulier dans les MN considérés comme la cible cellulaire primaire de la pathologie. Dans cette optique, deux grandes approches dominant :

- le remplacement directement du gène *SMN1* (thérapie génique virale)

- l'augmentation de la production de SMN par le gène *SMN2*

#### a) La thérapie génique basée sur les vecteurs AAV9-SMN1

La solution thérapeutique apparaissant comme la plus directe est la réintroduction du gène *SMN1* dans les cellules. Pour se faire, le transfert de gènes ou thérapie génique repose sur plusieurs éléments : le vecteur transportant la séquence d'acides nucléiques jusqu'aux cellules, la séquence en elle-même qui peut être optimisée et la voie d'administration.

- Le développement de la thérapie génique

La preuve de concept de la faisabilité du transfert de *SMN1* dans les cellules a été faite dans un premier temps *in vitro* dans des fibroblastes par un vecteur de type adénovirus. La restauration de l'expression de SMN conduit à la formation de Gems nucléaires et à la localisation de Gemin 2 dans ces structures (DiDonato et al., 2003). *In vivo*, les vecteurs lentiviraux ont été les premiers testés en combinaison avec *SMN1* pour restaurer SMN avec cependant une faible efficacité thérapeutique (Azzouz et al., 2004). Dans ce contexte un troisième vecteur a été utilisé : l'adénovirus associé ou AAV. Parmi les différents sérotypes, une étude a montré que l'injection intraveineuse de l'AAV-9 double brin ou scAAV9 (pour *self complementary Associated Adeno Virus*) permet de transduire efficacement différents organes : le cœur, les muscles, le foie le pancréas et les systèmes cardiovasculaires et entériques (Inagaki et al., 2006). Martine Barkats et son équipe ont complété ces travaux en montrant la transduction par le vecteur scAAV-9 des cellules de la moelle épinière dont les MN après une injection intraveineuse (Barkats, 2009; Duque et al., 2009). Cette découverte a été brevetée et a été utilisée pour développer un vecteur scAAV9 exprimant le transgène humain *SMN1* optimisé par l'ajout d'un intron avant la séquence codante (scAAV9-SMN1), sous le contrôle d'un promoteur PGK permettant une meilleure expression dans les neurones et dans le temps (Dominguez et al., 2011). Les résultats obtenus grâce à ce vecteur étaient alors sans précédents puisque les souris du modèle murin Delta7 passaient d'une survie de 16 jours à plus de 300 jours avec une médiane de survie de 160 jours. D'autres études ont également montré l'effet thérapeutique de cette approche en utilisant le promoteur CMV-beta chicken pour réguler l'expression du gène *SMN1* avec cependant des efficacités inférieures à la thérapie développée par l'équipe de Martine Barkats (Foust et al., 2010; Valori et al., 2010).

- L'optimisation de la voie d'injection du vecteur

Afin de pouvoir réduire les doses de vecteurs injectées pour cibler efficacement le SNC et les MN, les recherches se sont ensuite portées sur l'effet de l'injection du vecteur directement dans le SNC. La première voie envisagée a été l'injection Intra-Cérébro-Ventriculaire (ICV). Avec une dose réduite de  $2 \times 10^{10}$  génomes viraux (vg) /par souris contre entre 4.5 à  $5 \times 10^{10}$  vg/souris pour la voie intraveineuse, les souris delta7 traitées ont une survie et une prise de poids améliorée par rapport à celles traitées par IV (Glascock et al., 2012; Meyer et al., 2015). Ces résultats ont été confirmés par une seconde étude avec un AAV-SMN injecté en ICV et permettant la restauration de la protéine de l'ordre de 25 à 50% dans les tissus périphériques

(foie, cœur, muscle squelettiques) (Armbruster et al., 2016). Enfin, cette seconde étude souligne les effets bénéfiques d'une co-injection du vecteur sur la survie des souris. Bien qu'apportant des effets thérapeutiques notables notamment sur la survie dans le cadre de la SMA, la voie ICV a l'inconvénient majeur d'être très invasive et donc potentiellement peu transférable pour le traitement des patients. Pour répondre à cette problématique la voie intrathécale a été testée. Les résultats montrent aussi avec cette voie une augmentation de la survie des souris delta7 qui est cependant inférieure par rapport à celle obtenue par injection IV, IV+ICV ou ICV (Passini et al., 2014). Plusieurs équipes ont confirmé la capacité du vecteur AAV9 à transduire efficacement le SNC chez les primates non humains et les cochons rendant possible le transfert de cette technologie chez les patients (Duque et al., 2015; Inagaki et al., 2006; Meyer et al., 2015; Samaranch et al., 2011). L'injection de l'AAV9-SMN en intrathécal à ces animaux permet le retour de la fonction musculaire via les unités motrices et l'amplitude de contraction ainsi que le maintien du nombre de MN confirmant la faisabilité de la thérapie génique dans la SMA.

- Les essais cliniques basés sur l'injection de l'AAV9-SMN1

L'ensemble de ces résultats et notamment les essais d'une injection unique par IV de l'AAV-SMN dont l'expression est régulée par le promoteur CMV-béta chicken (Foust et al., 2010) ont permis le lancement d'un essai clinique pour les patients SMA-I en avril 2014 par la société AveXis créée en 2010 (Mendell et al., 2017). Ce tout premier essai clinique de thérapie génique pour la SMA rapporte que sur les 15 patients inclus, tous ont passé la médiane d'âge sans ventilation, ont survécu plus de 20 mois (8% des patients SMA-I passent normalement cet âge sans traitement) et à l'exception d'un patient tous ont passés des étapes de développement moteur jamais atteintes auparavant. En parallèle de cet essai deux autres menés par AveXis sont en cours : l'étude pivot (équivalent d'une phase III) STR1VE chez les patients SMA-I et une étude de l'injection intrathécale du vecteur chez les patients SMA-II (STRONG) âgés soit de moins de 2 ans soit entre 2 et 5 ans. Courant 2018, AveXis prévoit de lancer un essai européen sur une 30aine de patients SMA-I après avoir racheté la licence d'utilisation européenne de l'AAV9 et également deux autres essais : le premier pour les patients présymptomatiques (SPRINT) et un essai concernant toutes les formes de la maladie (REACH). Enfin, la dernière étape du développement de la thérapie AAV-SMN est le rachat d'AveXis pour 8,7 milliards de dollars par Novartis en avril 2018. Si cette thérapie est approuvée par les autorités de régulation, elle serait la première solution de thérapie génique des maladies neuromusculaires et rejoindrait la petite dizaine de traitements de thérapie génique actuellement autorisés.

#### **b) Les stratégies basées sur la stimulation de l'expression de SMN par le gène *SMN2***

Tous les patients atteints de la SMA liée au gène *SMN1* possèdent au moins une copie du gène *SMN2* capable de produire un transcrite *SMN* complet permettant la production d'une protéine SMN fonctionnelle. L'augmentation de l'expression de *SMN2* est donc une voie attractive, applicable à tous les patients et pouvant éviter l'introduction d'un gène exogène dans les cellules.

- Les oligonucléotides favorisant l'épissage de SMN

Cette technique permet de favoriser l'inclusion de l'exon 7 du gène *SMN2* lors de l'épissage du pré-ARNm et donc d'augmenter la proportion de protéine SMN complète. Cette technique utilise une courte séquence d'acides nucléiques anti sens (ASO) soit en changeant le groupe phosphate par un thiophosphate soit en changeant le ribose par un cycle morpholinos et le phosphate par un groupe phosphorodiamidate afin d'assurer une plus grande stabilité. Pour la SMA, la preuve de concept a été apportée en 2003 en augmentant le signal associé à SMN dans des fibroblastes de patients puis dans différents modèle animaux (Hua et al., 2008, 2011; Passini et al., 2011; Skordis et al., 2003).

Respectivement en mars 2016 et en avril 2017, la FDA puis l'EMA ont approuvé la première thérapie correctrice de la SMA liée à SMN : le Nursinersen (Spinraza, Biogen/IONIS)(Scoto et al., 2017). Dès les premiers essais cliniques, les résultats ont montré l'amélioration des scores moteurs, l'augmentation des potentiels d'action musculaires et la diminution du risque de devoir ventiler les patients(Finkel et al., 2016). La Haute Autorité de Santé régulant les applications des traitements, prévoit l'utilisation du Nursinersen pour les patients SMA-I et II mais pas III du fait de la faible efficacité du traitement chez ces patients. Le Nursinersen est disponible sous forme 12mg injectable en intrathécal selon le protocole suivant : 4 doses à 0, 2, 4 et 9 semaines puis une dose tous les 4 mois (EMA/736370/2017). La fréquence, la voie d'injection et le fait que beaucoup de patients ne peuvent pas subir de ponction lombaire sont des freins à l'utilisation de ce traitement.

- Les petites molécules favorisant l'épissage de l'ARNm *SMN2*

Comme pour les ASO présentés dans le paragraphe précédent, d'autres molécules favorisant l'épissage correct de *SMN2* et administrables par voie orale sont également à l'étude. La première, appelée SMN-C1, a été identifiée par screening et est développée par PTC therapeutics et Roche (Naryshkin et al., 2014). Les études pré cliniques sur les souris Delta 7 (SMA sévère) montrent une amélioration du phénotype et de la survie (Feng et al., 2016; Naryshkin et al., 2014). Ces résultats ont permis dès 2015 le lancement de plusieurs essais cliniques du RG7916 et du RG7800 chimiquement proches du SMN-C1 chez des patients respectivement SMA-I (MOONFISH, NCT02240355, phase I terminée en juillet 2015) et chez des patients SMA-I et SMA-II/III (FIREFISH, NCT02913482, phase II-III, fin estimée 2020 ; SUNFISH, NCT02908685 phase II-III, fin estimée 2020) (Scoto et al., 2017). La seconde molécule est développée par Novartis (Palacino et al., 2015). Les résultats précliniques sont plus modestes que ceux obtenus par Roche et l'essai clinique initié en 2015 (NCT02268552) a dû momentanément être stoppé pour cause d'effets indésirables (Scoto et al., 2017).

- Les desacétylases d'histones

Une autre solution permettant d'augmenter le niveau de SMN est d'augmenter la transcription du gène *SMN2*. Pour cela il est possible d'agir sur la régulation épigénétique de l'expression des gènes grâce à l'acétylation et la désacétylation des lysines présentes sur les

histones situées sur les promoteurs des gènes. Les Histones DesACétylase (HDAC) sont les enzymes intervenant dans la régulation épigénétique. L'inhibition de leur activité maintient les acétyles sur les histones et laisse la transcription de l'ADN possible. Plusieurs molécules approuvées sur le marché par les différentes organisations réglementaires ont été testées dans la SMA comme : le sodium Butyrate/ Phénylbutyrate, l'acide Valproic et la Trichostatin A. Toutes ces molécules ont réussi à augmenter l'expression de *SMN2* dans des lignées cellulaires de patients et dans des modèles animaux (pour revue : Calder et al., 2016). Pour les patients, plusieurs molécules ont montré des effets positifs, bien que limités pour des formes de SMA-II et III. Cependant les effets ne sont pas limités au gène *SMN2* et une toxicité a été relevée ainsi qu'un faible passage de la barrière hémato encéphalique limitant l'efficacité chez les patients.

### **1.2.6.2. Les traitements SMN-indépendants**

#### **a) Les neuroprotecteurs**

Pour ralentir la perte des motoneurons, Roche est actuellement en train de tester en essai clinique de phase II une molécule de la famille du cholestérol : l'Olesoxime (NCT02628743). Cette molécule agit en protégeant les mitochondries et permet l'augmentation de la survie de nombreux modèles de pathologies neuromusculaires incluant la SLA ainsi que le modèle de KO conditionnel de SMN dans les MN (Bordet et al., 2010). Les résultats du premier essai clinique montrent un ralentissement de la perte des fonctions motrices (Kirschner et al., 2014). Les données disponibles sur la base de données de brevets (*World Intellectual Property Organisation*, WIPO) semblent indiquer la volonté de combiner ce traitement avec une thérapie favorisant l'épissage de *SMN2* (n° de brevet AU2016353961). Cependant, Roche a annoncé en juin 2018 l'arrêt du développement de cette thérapie du fait des difficultés dans le choix de la dose, de la formulation et des obligations réglementaires pour accéder aux essais de phase III (source Fierce Biotech).

#### **b) Les stratégies thérapeutiques visant à préserver la fonction musculaire**

Dans le but de limiter les atteintes du muscle squelettique au cours de la maladie, plusieurs stratégies ont été envisagées.

Tout d'abord, les traitements médicamenteux permettant le maintien de la masse et de la fonction musculaire. La société Cytokinetics développe actuellement un activateur de la troponine : le reldesemtiv (CK-2127107) et un essai clinique de phase II est en cours sur des patients SMA-II, III et IV. Une seconde voie pour augmenter la masse musculaire est d'inhiber une protéine régulant la croissance du muscle : la myostatine. Une étude, a montré que la combinaison entre un modificateur de l'épissage de l'ARNm transcrit par le gène *SMN2* et un AAV exprimant la follistatine (inhibiteur de myostatine) permet l'augmentation de la survie et du poids ainsi que la diminution de l'atrophie (Feng et al., 2016). Une dernière solution médicamenteuse pourrait être l'inhibition de l'enzyme cholinestérase favorisant la

communication entre les MN et les fibres musculaires grâce au pyridostigmine bromide (Mestinon, Valeant) et déjà utilisé dans la myasthénie gravis. Deux essais cliniques de phase II ont été amorcés en 2014 et 2015 pour les patients SMA II-III et IV. En septembre 2018 aucun résultat n'est disponible sur le bénéfice de cette thérapie dans la SMA (NCT02227823 et NCT02941328).

Enfin, à côté des traitements médicamenteux, l'exercice physique peut également améliorer la fonction musculaire. Chez les souris SMA III, l'exercice aérobie de forte intensité en piscine ou en course de faible intensité permet de réduire la perte des MN et les défauts des JNM et d'améliorer la fonction musculaire indépendamment de SMN (Chali et al., 2016). Ces résultats ont permis l'ouverture d'une étude pilote chez des patients SMA-II et III (NCT02061189). Selon le protocole, une augmentation de la fonction oxydative ou de la force est observée chez les patients SMA III (Lewelt et al., 2015; Madsen et al., 2015). Enfin la thérapie par vibration du corps en entier est également testée chez les patients SMA III (NCT03056144) après démonstration d'une bonne tolérance de cette thérapie chez des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (Vry et al., 2014).

### **1.2.7. Du concept d'une maladie du motoneurone à une maladie multi-systémique**

#### **1.2.7.1. Rôle des motoneurones dans la physiopathologie de la SMA**

##### **a) Le paradigme des MN comme cible primaire de la SMA**

Très précocement dans la chronologie de l'étude de la SMA, des analyses anatomopathologiques post-mortem ont été réalisées sur des biopsies de moelles de patients SMA-I. Ces observations ont donc été faites à des stades très tardifs de la maladie et ont permis de constater la perte des MN dans la corne ventrale de la moelle épinière (Fig 8, Robertson et al., 1978-pour revue Crawford and Pardo, 1996).

En accord avec ces observations, des analyses en microscopie électronique ont constaté que le phénomène de mort par apoptose des MN qui survient au cours du développement embryonnaire humain, s'étend sur une période prolongée chez les fœtus SMA-I par rapport aux contrôles (Fidziańska and Rafalowska, 2002; Soler-Botija et al., 2002), et pourrait persister après la naissance (Simic et al., 2000). De ces observations, est apparue l'hypothèse selon laquelle la mort des MN serait le premier signe clinique de la pathologie.

La perte des motoneurones au cours de la SMA a par la suite été confirmée avec le développement des différents modèles murins de SMA (Tableau 4). Cependant, des analyses plus poussées ont mis en évidence que la diminution du nombre de MN ne devient significative qu'après que les souris ne soient entrées en phase symptomatique remettant en cause cette hypothèse. En effet, les souris hSMN2 (SMA-Ia) et Delta7 (SMA-Ib) présentent des défauts moteurs dès les premiers jours après la naissance, alors que la diminution du nombre de MN ne devient significative qu'au 5<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jours après la naissance, respectivement (Bäumer et al., 2009; d'Errico et al., 2013; Le et al., 2005; Monani et al., 2000). De même, chez

les modèles moins sévères SMA-III : la réduction du nombre MN devient significative à 3,5 mois pour les souris A2G (phénotype à l'âge adulte) et à 6 mois pour les souris *Smn*<sup>+/-</sup> (Jablonka et al., 2000; Monani et al., 2003). Enfin contrairement à ce qui est constaté *in vivo* et chez les patients, les MN isolés de souris SMA très sévères (hSMN2) ne présentent pas de diminution de la survie *in vitro* (Rossoll et al., 2002). Ces résultats laissent donc supposer que la mort des MN causée par la perte de *Smn* ou *SMN1* survient dans un contexte particulier.

Ces observations remettant en cause le rôle primaire de la mort des MN dans la progression de la pathologie, des modèles murins mutants conditionnels ont été développés pour éclaircir cette question. Ainsi, trois types de stratégies ont été décrites :

- la déplétion ciblée de SMN dans les MN
- la restauration ciblée de l'expression de SMN dans les MN dans un contexte SMA
- l'inhibition de l'apoptose des MN dans un contexte SMA

• **Effet de la déplétion ciblée de SMN dans les MN (Tableau 5)**

| Modèle  | Lieux de recombinaison   | Phénotype observé   | Référence                   |
|---|--|---|-----------------------------|
| NSE-Cre<br>+; <i>Smn</i> <sup>F7</sup> / <i>Smn</i> <sup>Δ7</sup> | Repartis dans différents tissus neuronaux et fuite dans tissus non neuronaux durant l'embryogénèse et à l'âge adulte | Signes précoces de déficits moteurs (dès 2 semaines post-natales), une atrophie musculaire caractéristique d'une dénervation une durée de vie réduite de 25 jours en moyenne  | Cifuentes-Diaz et al., 2002 |
| Olig2-Cre;<br>SMN2 <sup>+/+</sup> ; <i>Smn</i> <sup>F7/-</sup>    | Cerveau et moelle épinière (seulement MN) à partir de E10.5  | Signes de défauts moteurs (réflexe de retournement) distinguables entre le 2 <sup>ème</sup> jour et la 2 <sup>ème</sup> semaine. Réduction des MN au 40 <sup>ème</sup> jours 70% de ces souris mutantes ont une durée de vie supérieure à 12 mois | Park et al., 2010           |

**Tableau 5 : Modèles de déplétion ciblée de *Smn* dans les MN.**

Grâce au modèle murin *Smn*<sup>F7/F7</sup> dans lequel l'exon 7 du gène *Smn* est floxé, développé par l'équipe de Judith Melki (Frugier 2000), plusieurs études faisant appel à des Cre recombinases sous le contrôle de différents promoteurs neuronaux ont été menées afin de mieux définir l'effet de l'ablation ciblée du gène *Smn* dans les MN.

La première étude a été réalisée sur un modèle transgénique de souris *NSE-Cre*<sup>+</sup>;*Smn*<sup>F7</sup>/*Smn*<sup>Δ7</sup> par le même laboratoire (Cifuentes-Diaz et al., 2002; Frugier et al., 2000). Ces souris portent un allèle *Smn* muté (*Smn*<sup>Δ7</sup>), un allèle *Smn* floxé (*Smn*<sup>F7</sup>) et un transgène NSE-Cre assurant l'expression neurone-spécifique (cerveau et moelle épinière) de la Cre recombinase durant l'embryogenèse et à l'âge adulte (Forss-Petter et al., 1990; Frugier et al.,

2000). Ces souris développent des signes précoces de déficits moteurs (dès 2 semaines post-natales), une atrophie musculaire caractéristique d'une dénervation et présentent une durée de vie réduite de 25 jours en moyenne. De plus, une diminution massive du nombre d'axones moteurs (~78%) est observée en fin de vie des animaux par rapport à une diminution plus modérée du nombre de corps cellulaire des MN (~30%). Enfin, les auteurs rapportent des défauts morphologiques précoces des JNM dont une accumulation de neurofilaments au niveau des terminaisons synaptiques dès 2 semaines après la naissance.

Une étude plus récente a été réalisée sur le modèle de souris transgénique *Olig2-Cre;SMN2<sup>+/+</sup>;Smn<sup>F7/-</sup>* permettant de cibler plus spécifiquement les MN dès le stade de développement E10.5 (Park et al., 2010). Chez ces souris, des signes de défauts moteurs (réflexe de retournement) sont distinguables dès le 2<sup>ème</sup> jour après la naissance par rapport aux souris contrôles *Olig2-Cre;SMN2<sup>+/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* mais cette différence devient non significative à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine. Les souris mutantes présentent une diminution significative de poids par rapport aux contrôles ainsi qu'une atrophie musculaire et une diminution du nombre de fibres au cours de la croissance post-natale. Cependant, 70% de ces souris mutantes ont une durée de vie supérieure à 12 mois. De plus, la réduction du nombre de MN n'est observable que tardivement, au jour 40 après la naissance. Ces résultats confirment l'importance de SMN dans la fonction des MN. Cependant d'après cette étude, contrairement à l'utilisation de la *NSE-Cre* qui permet la délétion de *Smn* dans de nombreux tissus et qui induit une survie maximale de 25 jours, la délétion de *Smn* restreinte principalement aux MN conduit à un phénotype plus modéré et à une survie proche des contrôles.

- **Effet de la restauration ciblée de SMN dans les MN**
  - **Grâce à des modèles animaux transgéniques (Tableau 6) :**

| Modèle   | Lieu de recombinaison                   | Phénotype observé                                   | Référence                   |
|--|---|---|-----------------------------|
| SMN2 <sup>tg/tg</sup> ; Smn <sup>-/-</sup> ; PrPSmn  | Moelle épinière et fuite dans la muscle | Survie 150 jours<br>Maintient du nombre de MN       | Gavrilina et al., 2008      |
| SMN2 <sup>tg/tg</sup> ; SMNΔ7 <sup>tg/tg</sup> ; Smn <sup>Res/R</sup><br>es; ChaT <sup>Cre</sup> | MN, tronc cérébral E12.5                | Survie 23 jours et légère amélioration du phénotype | Martinez et al., 2012       |
| SMN2 <sup>tg/tg</sup> ; SMNΔ7 <sup>tg/tg</sup> ; Smn <sup>Res/Res</sup> ; HB9 <sup>Cre</sup>     | MN E9.25                                | Pas d'amélioration du phénotype                     | Paez-Colasante et al., 2013 |

**Tableau 6 : Modèles murins de restauration de SMN dans les MN.**

En parallèle, d'autres modèles murins transgéniques permettant la restauration de SMN uniquement dans les MN dans un contexte de SMA ont été développés.

Ainsi, les souris du modèle hSMN2 (SMA-Ia) exprimant une transgène murin *Smn* sous le contrôle du promoteur neuronal fort PrP montrent un nombre de MN identique aux contrôles SMA et une durée de vie moyenne augmentée de l'ordre de 150 jours contre 5 jours (Gavrilina et al., 2008). Cependant l'expression du promoteur PrP n'est pas restreinte aux MN et la protéine SMN est retrouvée dans différents tissus périphériques dont le muscle. Ces résultats montrent donc la nécessité d'exprimer SMN dans les tissus neuronaux pour restaurer la survie mais sans que le rôle de la restauration de SMN uniquement dans les MN ne puisse être évaluée.

D'autres équipes ont également développé des modèles permettant la restauration tissu spécifique de SMN. Pour cela, Lutz et ses collaborateurs ont modifié *Smn* en introduisant deux séquences à la place de l'exon 7 endogène et entourées par des séquences de recombinaison : l'exon 7 du gène humain *SMN2* dans le sens de la transcription et l'exon 7 du gène *Smn* dans le sens contraire à la transcription (*SMN2<sup>tg/tg</sup>; SMNΔ7<sup>tg/tg</sup>; Smn<sup>Res/Res</sup>*) (Lutz et al., 2011). Les souris homozygotes transcrivent donc dans 100% un pre-ARNm contenant l'exon 7 du gène *SMN2* ce qui conduit donc après épissage à 90% d'ARNm *Smn* auquel il manque l'exon 7. Le croisement de cette lignée de souris avec une seconde lignée exprimant une recombinaise CRE permet la recombinaison du gène *Smn<sup>Res/Res</sup>* et met l'exon 7 *Smn* dans le sens correcte conduisant à 100% des ARNm transcrits contenant l'exon 7. Afin de restaurer l'expression de SMN spécifiquement dans les MN, ces souris ont été croisées avec une lignée exprimant une Cre recombinaise sous le contrôle du promoteur *ChAT* actif dans la corne antérieure de la moelle épinière et dans le tronc cérébral à partir du stade de développement E12.5. Les souris résultant de ce croisement montrent une amélioration des scores moteurs et une légère augmentation de la survie de 23 jours contre 15 jours pour les souris SMA contrôles (Martinez et al., 2012). Cependant, le poids des souris et le nombre de MN restent éloignés des souris contrôles non malades. Une étude similaire basée sur l'utilisation d'un autre promoteur spécifique des MN (*Hb9*) conduit à une expression plus faible de SMN limitée aux MN par rapport à *ChAT* (Paez-Colasante et al., 2013). Avec ce second promoteur aucune augmentation de la survie, du poids et des scores comportementaux ne sont observés.

Au total, ces différentes études démontrent que la restauration ciblée de SMN dans les MN ne permet qu'une amélioration partielle du phénotype des souris SMA.

- **Grâce à l'injection de vecteurs AAV-SMN ou des ASO**

L'amélioration limitée du phénotype des souris SMA lorsque la restauration de SMN est restreinte aux MN et dans le SNC a également été constatée lors de la recherche de l'efficacité thérapeutique des différents traitements. En effet, aucune augmentation de la survie est constatée lorsque les souris sont traités soit avec un AAV9 exprimant le transgène SMN sous le promoteur neuronal de la synapsine soit avec des ASO en injection dans le cerveau et ciblant uniquement le système nerveux central (Besse et al. en préparation, Hua et al., 2011, 2015).

- **Effet de l'inhibition de la mort des MN sur le développement de la SMA**

Comme nous l'avons vu précédemment, la perte des MN observée dans la SMA est due à l'apoptose de ces cellules et le mauvais épissage de certains ARNm dont *Mdm2* et *Mdm4* pourrait en être la cause (Van Alstyne et al., 2018). Dans cette étude les auteurs ont restauré l'expression correcte de ces 2 ARNm par une injection intra cérébro ventriculaire dès la naissance dans des souris SMA sévère Delta7. Grâce à cette méthode, le nombre de MN est supérieur aux souris non injectées. Cependant, les souris SMA injecté par cet AAV ont une survie et des capacités motrices identiques aux souris non traitées. Comme anticipé dans les essais de neuroprotections, ces résultats montrent que l'inhibition de l'apoptose des MN n'est pas suffisante à contrer les effets de la perte de SMN dans l'organisme.

#### **1.2.7.2. Les défauts des JNM sont antérieurs à la diminution du nombre de MN au cours de la SMA**

Chez les patients, les observations des JNM ont été réalisées à des stades terminaux de la maladie empêchant l'étude de la progression de la maladie. Cependant chez la souris, plusieurs articles ont montré des détériorations structurales et fonctionnelles au niveau des JNM à des temps précoces. Dès la naissance, les gènes codants pour des protéines synaptiques sont progressivement sous exprimées entre le 1<sup>er</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour après la naissance pour le modèle très SMA très sévère hSMN2 (Dachs et al., 2011). Pour le modèle SMA sévère Delta 7, la quantité de la sous unité  $\gamma$  de l'AchR est augmentée indiquant l'immaturité du récepteur (Kariya et al., 2008). Ces défauts sont accompagnés de détériorations de la structure de la JNM en elle-même avec une diminution de la surface et des perforations de la plaque motrice ainsi qu'une accumulation des neurofilaments à l'extrémité distale des axones. La densité des vésicules et des mitochondries est également plus faible dans les souris SMA par rapport aux contrôles (Kong et al., 2009). Ces défauts concernent à la fois les modèles sévères et plus modérés SMA II-III comme les souris SMA A2G (Dachs et al., 2011; Kariya et al., 2008).

De plus, le fonctionnement des JNM dans la SMA est également affectée avec des défauts de relargage des vésicules synaptiques et une réponse de la fibre musculaire plus faible après le relargage d'une vésicule (Kong et al., 2009).

Les défauts de la JNM concernent également les modèles murins de KO conditionnels de SMN dans les MN (*NSE<sup>Cre+</sup>*; *Smn<sup>F7/ $\Delta$ 7</sup>* et *Oligo2<sup>Cre+</sup>*; *Smn<sup>F7/ $\Delta$ 7</sup>*) (Cifuentes-Diaz et al., 2002; Park et al., 2010). Les auteurs de ces études ont constaté une accumulation des neurofilaments et des défauts de structure de la jonction. Enfin les myotubes en culture de patients SMA présentent une diminution de l'expression et de l'agrégation des AchR indiquant que le compartiment musculaire pourrait participer aux défauts observés sur la jonction (Arnold et al., 2004).

Ainsi, l'ensemble de ces données démontre que le déficit en SMN affecte la maturation et la fonction des JNM. De plus, ces défauts sont détectables avant la phase de mort des MN qui ne devient significative qu'après l'entrée en phase symptomatique montrant que les JNM sont parmi les premières structures affectées par la SMA (Fig 8) (Dachs et al., 2011; d'Errico et al., 2013; Le et al., 2005; Monani et al., 2003).

### **1.2.7.3. Implication des muscles squelettiques dans la physiopathologie de la SMA**

#### **a) Phénotypes musculaires des patients SMA**

L'atteinte progressive des muscles fait partie des caractéristiques majeures de la SMA. Cliniquement cela s'observe par la perte progressive du volume musculaire et de la mobilité allant jusqu'au décès du patient dans les formes les plus sévères (Fig 8).

Durant la période prénatale, les fibres des patients SMA-I ont une taille significativement plus petite que celles des patients contrôles et sont regroupées et entourées de plus grosses fibres (Martínez-Hernández et al., 2009).

L'observation en microscopie optique de coupes transversales de muscles après la naissance montre une grande hétérogénéité dans la taille des fibres avec de nombreuses fibres atrophiques aussi bien rapides que lentes, mais également des fibres de taille normale et hypertrophiques majoritairement lentes (Martínez-Hernández et al., 2009; Roy et al., 1971; Szliwowski and Drochmans, 1975; Martínez-Hernández et al., 2014)

Les analyses des muscles de patients SMA suggèrent également un retard de la myogenèse. En effet, un pourcentage légèrement plus élevé de fibres exprimant la myosine fœtale a été observé sur des biopsies musculaires prénatales de patients SMA de type I par rapport aux contrôles sains du même âge (patients contrôles : 79% des fibres, SMA I : 86%)(Martínez-Hernández et al., 2014). De même, après la naissance, la proportion de fibres positives pour la myosine embryonnaire est supérieure dans les muscles de patients SMA de type I par rapport aux patients sains (Martínez-Hernández et al., 2014; Stevens et al., 2008; Tews and Goebel, 1996).

Enfin, chez les patients touchés par une forme moins sévère de la SMA, plusieurs auteurs notent un phénotype musculaire proche de celui observé dans la dystrophie musculaire comprenant des fibres en dégénérescence/régénération et un niveau sérique élevé de créatine kinase (Muqit et al., 2004; Nicole et al., 2002).

#### **b) Rôle de SMN dans la stabilité des fibres musculaires**

L'analyse plus fine de SMN dans le muscle squelettique montre que sa localisation varie au cours du développement. En effet, durant l'embryogenèse, SMN forme des structures en forme de points uniquement retrouvées dans le sarcoplasme des muscles et est également retrouvée au niveau des membranes des fibres musculaires (Burlet et al., 1998). Après la naissance, dans les fibres musculaires de drosophiles et de souris, SMN est principalement localisée sous forme granulaire et au niveau de la bande Z (Rajendra et al., 2007; Walker et al., 2008). Toujours chez la souris, des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que SMN peut interagir avec l' $\alpha$ -actinine une protéine de la bande Z impliquée dans la réticulation de l'actine. Les autres éléments du complexe SMN, les protéines Gemin 2-3-4-6-8

mais pas les UsnRNP, sont également retrouvés à ce niveau suggérant un rôle indépendant de la maturation des snARN de SMN au niveau de la bande Z des fibres musculaires (Walker et al., 2008).

De plus, l'observation par microscopie électronique de la structure des muscles des patients SMA après la naissance a révélé la désorganisation des myofibrilles avec une désorientation du sarcomère, des irrégularités dans la densité des bandes Z et des fragments musculaires délimités par une membrane (Fidziańska et al., 1990; Szliwowski and Drochmans, 1975). De façon similaire, les fibres musculaires des modèles murins de SMA très sévère (hSMN2) présentent de nombreux défauts morphologiques avec la présence de vacuoles, de rétrécissements du sarcolemme et des défauts dans l'espace des disques Z (Walker et al., 2008). En conséquence, les sarcomères ne sont pas alignés entre eux et ont une taille réduite.

En plus des défauts de structure, les noyaux des fibres musculaires de patients et des modèles animaux sont fragmentés signe de l'apoptose de ces cellules (Iwahashi et al., 1997; Tews and Goebel, 1996). Dans les souris taiwanaises (SMA-Ib/II), ces observations ne sont pas retrouvées durant le développement embryonnaire mais apparaissent dès la naissance soit avant la mort des MN (Fayzullina and Martin, 2014).

Le muscle squelettique étant en relation étroite avec les MN par l'intermédiaire des JNM, il est difficile de savoir si les atteintes musculaires observées au cours de la SMA sont uniquement la conséquence de l'atteinte des MN et/ou dues à un rôle muscle spécifique de SMN.

Un premier élément de réponse a été fourni par une étude de l'équipe de Judith Melki sur le modèle murin KO conditionnel  $Smn^{\Delta7/F7}; HSA-Cre$  dans lequel la Cre recombinase est sous le contrôle du promoteur de l'actine squelettique humaine (HSA) exprimée dans les fibres musculaires (Frugier et al., 2000)(Cifuentes-Diaz et al., 2001). En effet, ces souris ont une durée de vie fortement réduite ne dépassant pas 37 jours après la naissance. A partir de 4 semaines, les souris KO sont paralysées et des signes sévères de dystrophie sont observés à savoir, la présence de fibres nécrotiques, des signes de dégénérescence / régénération ainsi que de la fibrose. Cette étude suggère donc un rôle muscle spécifique de SMN, notamment dans la stabilité des fibres musculaire. En outre, la forte réduction de la survie de ces souris sans qu'aucune atteinte des MN ne soit rapportée supporte l'hypothèse d'une contribution du muscle à la physiopathologie de la SMA.

### **c) Les cellules souches musculaires et la SMA**

Plusieurs études de microscopie électronique ont rapporté une dérégulation du nombre de CS sur des biopsies de patients SMA type I par rapport à des muscles néonataux contrôles (van Haelst, 1970; Saito, 1985). De même, plus récemment une étude par immunofluorescence a montré une augmentation du nombre de CS Pax7+ dans les muscles de patients SMA type I, suggérant des défauts de myogenèse post-natale (Martinez et al., 2012).

Cependant, ces prélèvements étant obtenus en post mortem dans la majorité des cas, il est difficile d'avoir un suivi du développement musculaire au cours de la maladie. Pour élucider ce point, plusieurs études ont donc utilisé les modèles animaux. De façon intéressante, l'aire des fibres des souris SMA hSMN2 et Delta7 ne varie pas entre les stades pré- et post-symptomatiques (Dachs et al., 2011; Kong et al., 2009; Lee et al., 2011). Ces données laissent supposer que l'atrophie musculaire caractéristique de la SMA pourrait être due à une fusion prématurée des cellules lors de la myogenèse post natale. En accord avec ces données plusieurs études sur des modèles murins hSMN2 (SMA-I) s'accordent pour montrer une dérégulation des CS lors du processus de myogenèse post natale. Une première étude montre par immunofluorescence une augmentation des cellules en prolifération (Pax7+/MyoD+) et des cellules formant le pool des SC quiescentes (Pax7+/MyoD-) 2 jours après la naissance des souris SMA très sévères hSMN2 (Hayhurst et al., 2012). Une seconde étude rapporte également des dérégulations par RT-qPCR de plusieurs facteurs myogéniques (Pax7, MyoD et MyoG) dans les muscles de souris hSMN2 et dans le modèles moins sévère *Smn*<sup>2B/-</sup> (Boyer et al., 2014). Enfin les muscles des deux modèles présentent une augmentation des noyaux centraux montrant un retard dans la maturation des fibres néoformées (Boyer et al., 2014).

Ces défauts de différenciation des CS déficientes en SMN ont été confirmés *in vitro*, à partir de myoblastes de patients SMA. (Guettier-Sigrist et al., 2001). De même, la réduction de SMN dans des myoblastes murins immortalisés (C2C12) par un shARN inhibe fortement la fusion et altère la morphologie des myotubes (Shafey et al., 2005). Les myoblastes dérivés de muscles de souris delta-7 (SMA sévère) montrent également une différenciation précoce *in vitro* causée par un niveau d'expression plus faible de *Pax7* et à l'inverse plus fort de *MyoD*, *MyoG* et du miR206 (Bricceno et al., 2014). Enfin, la mobilité de ces myoblastes est diminuée en raison d'altérations du cytosquelette d'actine et de l'absence de renouvellement des adhésions focales qui font le lien entre la matrice extra cellulaire et la membrane. De plus, des expériences de dénervation induite par chirurgie sur ces souris ont montré que le niveau d'expression de *Pax7* et *MyoD* était indépendant de l'innervation durant la myogénèse post natale (Boyer et al., 2014). Ces données suggèrent donc que la dérégulation des CS lors de la myogénèse post natale pourrait être indépendante de l'innervation du muscle sous tendant un rôle CS spécifique de SMN.

Un autre aspect intéressant du rôle de SMN dans les CS est la modulation de la sévérité du phénotype de KO conditionnel de SMN dans la fibre musculaire (Nicole et al., 2003). Nous avons vu précédemment qu'un KO de *Smn* dans les fibres musculaires conduit à un phénotype dystrophique et à la mort des souris 30 jours après la naissance (Cifuentes-Diaz et al., 2001). Dans ce modèle, les souris ont pour génotype *Smn*<sup>Δ7/F7</sup>; HSA-Cre. Après la recombinaison de l'allèle *Smn* floxé F7, la protéine SMN est donc absente dans les fibres musculaires et réduite dans les autres cellules, par rapport aux souris sauvages. Pour maintenir l'expression de *Smn* dans les CS, les auteurs ont créé le modèle *Smn*<sup>F7/F7</sup>; HSA-Cre. Avec ce génotype, seules les fibres musculaires des souris sont déplétées en SMN. Dans ces conditions, les souris montrent une augmentation de la médiane de survie de 8 mois contre 1 mois pour les souris *Smn*<sup>Δ7/F7</sup>;

HSA-Cre. Les muscles des souris sont préservés et entament un processus de dégénéscence / régénération des fibres musculaires seulement à partir de 2 mois. La diminution du nombre de fibres n'est observable que 6 mois après la naissance s'accompagnant d'une réduction des fonctions motrices. Cette étude montre donc que l'expression complète de *Smn* est donc nécessaire aux cellules souches musculaires pour assurer le maintien de l'intégrité des fibres musculaires déficientes en SMN.

#### **d) Effet de la restauration ciblée de SMN dans le muscle et des thérapies muscle spécifiques**

Certaines données suggérant un rôle spécifique de SMN dans le muscle, plusieurs études se sont par la suite intéressées à l'effet de la restauration ciblée de SMN dans ce tissu et au bénéfice thérapeutique d'un traitement muscle spécifique.

Une première étude a montré que l'expression de SMN sous le contrôle du promoteur HSA, c'est-à-dire uniquement dans les fibres musculaires, chez les souris *SMN2<sup>tg/tg</sup>;SMNΔ7<sup>tg/tg</sup>*; *Smn<sup>Res/Res</sup>* n'améliore pas leur phénotype (Gavrilina et al., 2008). Ces résultats ne sont pas surprenants compte tenu du rôle précoce que SMN semble jouer durant la myogenèse post natale.

Une autre équipe a ré-exprimé *Smn* dans les précurseurs myogéniques chez les souris Delta-7, grâce aux promoteurs de *Myf5* et *MyoD* s'exprimant dès le stade embryonnaire E15.5 dans les muscles et également dans certaines cellules de la moelle épinière pour *Myf5* (Martinez et al., 2012). Avec les 2 promoteurs, les auteurs ont observé une légère augmentation de la survie, du poids, des habilités motrices et de l'aire des fibres sans cependant avoir d'effet sur la perte des MN.

Comme nous l'avons constaté pour les MN, la restauration de SMN uniquement dans le muscle, n'est pas suffisante pour restaurer la survie des souris SMA.

#### **e) Rôle rétrograde des fibres musculaires SMA sur la survie des MN**

Une étude *in vitro* a comparé des co-cultures de myoblastes et de MN embryonnaires de rats, en utilisant des myoblastes provenant de patients SMA-I,II et III ou d'individus contrôles ou encore de patients affectés par d'autres maladie neuromusculaires (SLA, myopathie de Duchenne, neuropathie périphérique) et affectant le système nerveux central (maladie de Parkinson) (Braun et al., 1995). Dans un premier temps, les cultures montrent les signes d'une bonne connexion entre les fibres musculaires et les neurones avec notamment le déclenchement spontané de contractions. Cependant après seulement 1 à 3 semaines, uniquement les co-cultures faites à partir des myoblastes des patients SMA-I et II dégèrent. Durant cette phase, les sarcomères des fibres commencent à se désorganiser et des vacuoles apparaissent dans le cytoplasme. De façon intéressante, en l'absence des MN ce phénotype n'est pas observé. L'induction de la dégénéscence apparait être indépendante de facteurs solubles sécrétés dans le milieu de culture et ne peut pas être arrêtée par l'ajout de facteurs neurotrophiques (Braun et al., 1997). La dégénéscence des cultures est donc

indépendante de l'origine des MN et est dose dépendent de SMN (Guettier-Sigrist et al., 1998). Dans une autre étude de co-cultures, les MN de rat rentrent en apoptose quelle que soit l'origine des myoblastes. Cependant, la mort des MN est accélérée lorsque les myotubes sont formés à partir de CS de patients SMA (Guettier-Sigrist et al., 2002). Ces expériences montrent donc que la dégénérescence des cultures de myoblastes SMA est induite par l'innervation et apportent la preuve de concepts *in vitro* de l'effet rétrograde des fibres formées à partir de myoblastes de patients SMA sur la survie des MN.

#### **1.2.7.4. Les autres cellules et tissus potentiellement impliqués dans la SMA**

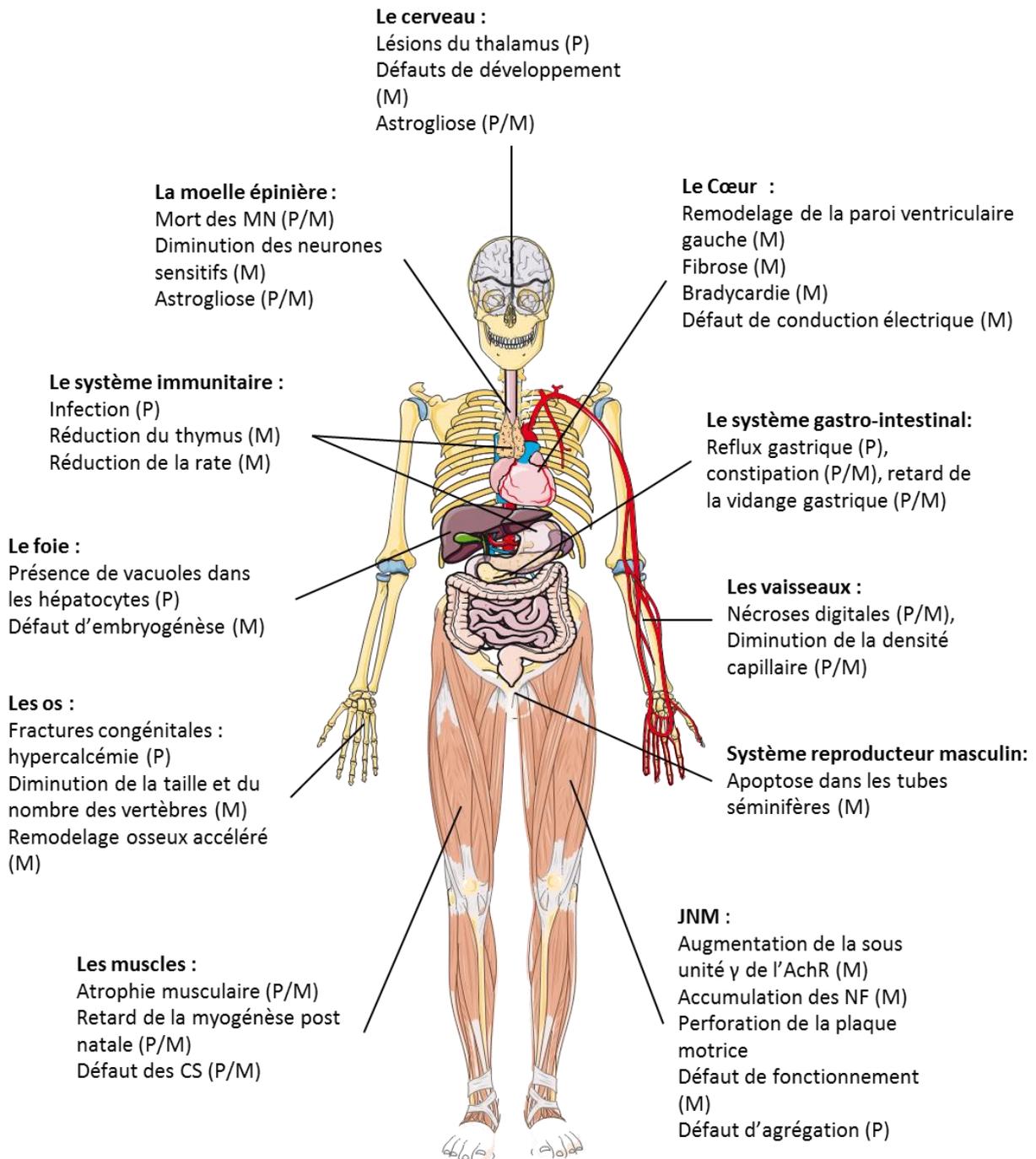
Comme évoqué précédemment, bien que les MN soient la cible principale de la SMA, les défauts du muscle squelettique, des cellules souches musculaires et des JNM apparaissent précocement, avant même que la perte des MN ne soit significative. De plus, de nombreuses données montrent que beaucoup d'autres tissus sont affectés par le déficit en SMN, faisant de la SMA une maladie multi-systémique (pour revue Hamilton and Gillingwater, 2013, Fig 8)

##### **a) Défauts observés dans les autres constituants du système nerveux**

En plus des MN et des JNM, d'autres parties du système nerveux sont également touchées dans la SMA. Les biopsies de patients SMA très sévères présentent une diminution de la densité des fibres neuronales constituant le nerf sural, un nerf sensitif des membres inférieurs (Rudnik-Schöneborn et al., 2003). Les souris SMA-Ib (Delta7) ont une diminution de presque 30% des synapses de l'arc réflexe situé dans les colonnes latérales de la moelle ainsi qu'une diminution des neurones sensitifs propriocepteurs (Ling et al., 2010; Mentis et al., 2011).

Au niveau du cerveau, des études par Imagerie à Résonance Médicale ont montré la présence de lésions dans le thalamus de patients SMA (Ito et al., 2004; Shishikura et al., 1983). *In vivo*, la réduction de SMN conduit à des défauts de développement du cerveau du modèle murin sévère hSMN2 (Wishart et al., 2010).

Enfin, les astrocytes sont également affectés dans la SMA. Ces cellules sont les plus abondantes du SNC et ont de nombreux rôles comme : la formation de la barrière hémato-encéphalique et la régulation de l'environnement métabolique des neurones dont les ions et le glucose. Les biopsies de moelle provenant de patients SMA montrent des signes associés à de l'astrogliose (Rindt et al., 2015). Dans les souris du modèle murin SMA-Ib (Delta 7), les astrocytes sont activés dès la phase pré-symptomatique et leur morphologie est également modifiée (McGivern et al., 2013). *In vitro*, les astrocytes dérivés d'IPS de patients SMA



**Figure 8 : Schéma des différents organes affectés dans la SMA (P) : patient, (M) : modèle murin.**

reproduisent ces caractéristiques et l'étude métabolique de ces cellules révèle des dérégulations du niveau basal de calcium (McGivern et al., 2013; Zhou et al., 2016). Enfin, la restauration de SMN uniquement dans les astrocytes permet une augmentation de la survie de 14 jours pour les souris delta 7 à 60 jours pour les souris traitées et une amélioration de la taille des JNM (Rindt et al., 2015).

## b) Système cardiovasculaire

De nombreux cas de pathologies cardiaques ont été décrits chez des patients SMA (Bürglen et al., 1996b; Cook et al., 2006; El-Matary et al., 2004; Menke et al., 2008, 2008; Møller et al., 1990; Mulleners et al., 1996). Ces pathologies concernent près de 25% des patients SMA-I et sont également retrouvées chez certains patients atteints de SMA-III (Fig 8) (Bach, 2007; Elkohen et al., 1996; Roos et al., 2009; Tanaka et al., 1976)

De même, une étude histologique sur les modèles murins hSMN2 et Delta7 a montré des défauts dans le remodelage cardiaque au niveau du septum et de la paroi ventriculaire gauche ainsi qu'une fibrose interstitielle probablement dus à un stress oxydatif dès l'embryogenèse (Shababi et al., 2010). De plus, des défauts de conduction électrique sont observables chez les souris Delta7 et conduisent à la réduction du rythme cardiaque et à des blocages ventriculaires (Heier et al., 2010; Shababi et al., 2010). Les essais de thérapie génique sur les souris delta7 avec le vecteur scAAV9-SMN montrent une amélioration dans la structure et la fonction cardiaque, 14 jours après la naissance pour les souris traitées sans que la restauration ne soit complète Fig 8) (Bevan et al., 2010; Shababi et al., 2010).

Le système vasculaire est également affecté dans la SMA. En effet, il est fréquent de constater chez les patients SMA-I des nécroses digitales dues à des occlusions thrombotiques des capillaires et une réduction de la perfusion des muscles (Araujo et al., 2009; Rudnik-Schöneborn et al., 2010; Somers et al., 2015). Ces défauts sont également observables dans les modèles murins *in vivo* (hSMN2, delta7 et Taïwanaise) qui présentent une diminution de la densité des capillaires et une hypoxie de plusieurs tissus dont la moelle épinière et le système gastro intestinal (Sintusek et al., 2016; Somers et al., 2012, 2015).

### **c) Système gastro-intestinal, foie, pancréas et perturbations métaboliques**

Aucune donnée chiffrée ne décrit un défaut de la fonction gastro-intestinale chez les patients SMA, cependant un consensus international met en avant la présence de reflux gastriques, de constipations et de retards dans la vidange gastrique (Wang et al., 2007). Le tube digestif possède son propre système nerveux composé de neurones moteurs, sensoriels et d'interneurones lui permettant de détecter les stimuli et d'engager de manière synchronisée les différentes fonctions motrices. Un KO conditionnel de SMN dans les cellules Nestine positives, dont font parties les cellules du plexus mésentérique, déclenche chez les souris des défauts gastriques comme ceux décrits chez les patients : une diminution du transit intestinal, de la mobilité colique et une constipation (Gombash et al., 2015). Ces modifications se font sans variations de la consommation d'eau et de nourriture par les souris. Une seconde étude portant sur le modèle taiwanais (Souris SMA-Ib) montre une augmentation de la taille relative de l'intestin indiquant une disproportion dans le développement de cet organe (Sintusek et al., 2016).

De façon physiologique, le foie est caractérisé par un taux élevé de SMN, supérieur à celui de la moelle épinière chez l'adulte (Coovert et al., 1997). Dans les biopsies de patients SMA, des vacuoles sont observables (Coovert et al., 1997; Crawford et al., 1999). Les conséquences du KO de *Smn* dans le foie des souris *Alfp<sup>Cre+</sup> ; Smn<sup>F7/F7</sup>* est une mort embryonnaire tardive

entre les stades de développement E18 et E21 due à des défauts d'embryogenèse et non à de l'apoptose (Frugier et al., 2000; Vitte et al., 2004). Les auteurs n'ont rapporté aucune de ces perturbations pour les souris *Smn<sup>+F7</sup>*, indiquant que ces résultats ne seraient observables que dans des formes très sévères de la maladie (Fig 8).

Certains patients SMA-I présentent également un défaut dans le métabolisme des acides gras (Crawford et al., 1999). Les souris 2B (SMA-II) ont un taux normal d'insuline mais montrent des signes d'intolérance au glucose et un taux élevé en glucagon (Bowerman et al., 2012). Les auteurs de cette étude ont également constaté une hyperglycémie à jeun associée à des défauts de métabolisation du glucose par le foie et le muscle (Fig 8)

Au niveau cellulaire, le pancréas présente un taux élevé de cellules  $\alpha$  productrices de glucagon chez les patients et une réduction des cellules  $\beta$  productrices d'insuline.

#### **d) Le squelette**

Parmi les patients SMA-I plusieurs cas de fractures congénitales et d'hypercalcémie ont été décrits (Felderhoff-Mueser et al., 2002; García-Cabezas et al., 2004; Kelly et al., 1999; Khatri et al., 2008; Khawaja et al., 2004; Vaidla et al., 2007). Les souris taiwanaises présentent également des défauts squelettiques dont : une diminution de la taille et du nombre des vertèbres caudales et de la qualité osseuse observée par rayons-X (Fig 8)(Shanmugarajan et al., 2007).

L'étude 3D des vertèbres et des fémurs montre une diminution de la densité osseuse, de la zone corticale et des trabécules osseux (Shanmugarajan et al., 2009). Dans ce modèle, le remodelage osseux est également accéléré à cause du déséquilibre entre la diminution de l'expression des gènes de la matrice minérale (*ostéocalcine*, *ostéopontine* et *ostérix*) et l'augmentation du nombre des macrophages osseux (ostéoclastes) détruisant la matrice.

#### **e) Système immunitaire**

Certains patients sont touchés par des candidoses récurrentes et des pneumonies retrouvées habituellement chez des patients immunodéprimés (Bach, 2007; Manna et al., 2009). Dans différents modèles murins SMA sévères et intermédiaires, le poids de plusieurs organes intervenant dans la lymphopoïèse (rate et thymus) est réduit (Fig 8) (Dachs et al., 2011; Deguise et al., 2017; Khairallah et al., 2017; Thomson et al., 2017). Egalement, plusieurs défauts de maturation des lymphocytes sont observés chez les souris dont une apoptose des cellules en cours de maturation (CD4+CD8+) (Dachs et al., 2011; Deguise et al., 2017)

#### **f) Système reproducteur**

Seul le système reproducteur masculin semble être affecté par la diminution de SMN. En effet, une augmentation du nombre de cellules en apoptose a été observée dans les tubes séminifères des souris SMA-III (*Smn1<sup>tm5(Smn1/SMN2)Mrph</sup>*), entraînant une diminution du poids relatif des testicules sans que cela n'impacte le niveau de testostérone, la fertilité et le nombre de progénitures (Fig 8) (Ottesen et al., 2016). Chez les drosophiles, le KO de SMN chez les

mâles conduit à des défauts de différenciation et à l'apoptose des cellules souches germinales (Grice and Liu, 2011).



### **1.3. La voie de l'ARN interférence (ARNi)**

#### **1.3.1. Définition**

La voie de l'ARN interférence (ARNi) est un procédé impliquant des ARN courts non codants (20-30nt) dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Cette régulation a été pour la première fois identifiée en 1993 chez *Caenorhabditis elegans* par l'équipe de V. Ambros qui a constaté que le niveau de l'ARN *lin-4* était inversement corrélé à celui de la protéine Lin-14 grâce à la présence de deux séquences de 22 et 60 nucléotides présentes sur le gène *lin-4* complémentaires de la séquence 3'UTR du gène *Lin-14* (Lee et al., 1993). Bien que les séquences codantes pour l'ARNi aient évolué indépendamment selon les espèces, les éléments de maturation constituant cette voie sont retrouvés dans de nombreux eucaryotes signe que ce mécanisme est ancien dans l'évolution (Shabalina and Koonin, 2008).

Parmi les ARN courts intervenant dans l'ARNi plusieurs classes sont décrites :

#### **a) les microARN (miARN)**

Les miARN représentent la classe d'ARN courts la plus décrite pour le procédé d'ARNi. Leur origine est strictement endogène, ils constituent 5% du génome humain et régulent 30% des gènes. Ces ARN se distinguent par leur structure tridimensionnelle constituée d'une tige formée de deux brins non totalement appariés et d'une boucle. Ces éléments sont fondamentaux pour leur maturation et seront détaillés ultérieurement dans ce chapitre. Aussi, la dérégulation de miARN spécifiques a été reliée à de nombreux types de maladies comme les cancers, les maladies neurodégénératives et musculaires (pour revue Di Leva et al., 2014; Qiu et al., 2015; Sibley and Wood, 2011; Valsecchi et al., 2015; Volonte et al., 2015).

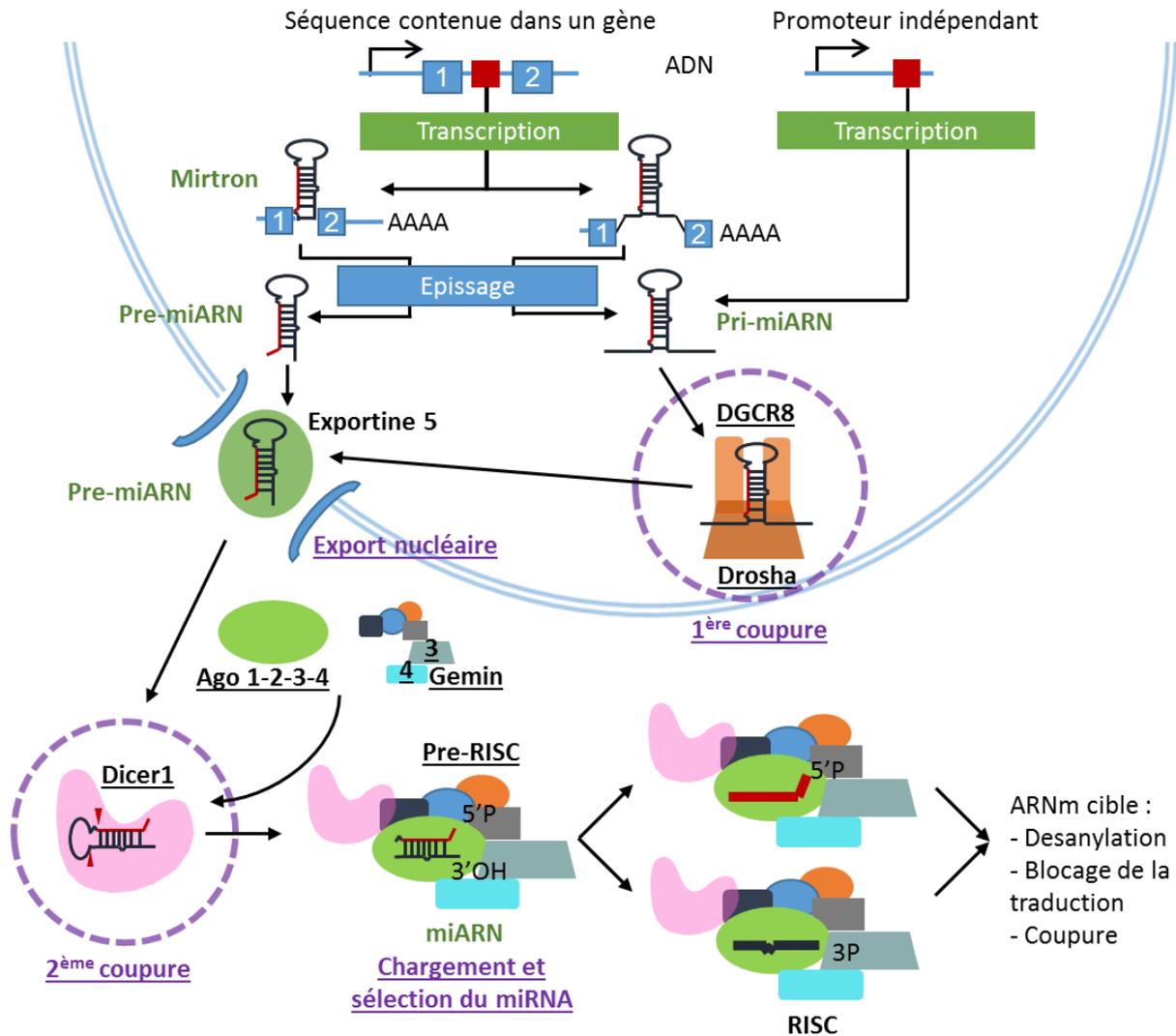
#### **b) les petits ARN interférents (siARN pour *small interfering*)**

Les siARN utilisent les mêmes machineries protéiques pour leur maturation que les miARN. La différence vient du fait qu'ils sont d'origine exogène, c'est-à-dire qu'ils proviennent généralement de virus en répllication ou ils ont été artificiellement introduits dans le cytoplasme des cellules. Il existe cependant des siARN dits endogènes provenant de transposons ou de pseudo gènes (Kim et al., 2009). Enfin, contrairement aux miARN, les siARN sont parfaitement appariés sous la forme double brin et ne présentent pas de structure de type tige boucle.

#### **c) les ARN interagissant avec Piwi (piARN pour *piwi-interacting*)**

Ces ARN d'une longueur comprise entre 24 et 32 nt tiennent leur nom de leur association avec Piwi, une protéine de la famille Argonaute associée à la régulation des ARNi. Dans l'organisme, leur rôle est principalement de protéger les cellules de la lignée germinale de l'intégration ou de la relocalisation de transposons de façon aléatoire (Ishizu et al., 2012). Les piARN ont également été impliqués dans d'autres procédés cellulaires comme le contrôle épigénétique de la plasticité synaptique dans le SNC (Rajasethupathy et al., 2012).

### 1.3.2. Voie canonique de biogenèse des miARN



**Figure 9 : Schéma de la voie canonique de maturation des miARN.**

#### 1.3.2.1. Transcription et première coupure

##### a) La transcription des gènes des miARN

Les séquences codantes pour les miARN, sont situées soit dans des régions inter-géniques ou orientées en antisens de gènes connus (50% des cas) soit au niveau des introns, des exons ou des séquences 3' UTR (40% des cas) (Fig 9) (Rodriguez et al., 2004; Stroynowska-Czerwinska et al., 2014).

La transcription des gènes des miARN donne un premier intermédiaire primaire appelé pri-miARN d'une longueur variable de l'ordre du kilo base. Du fait de la longueur plus courte des pri-miARN par rapport aux ARNm, il a été pensé que ces ARN pourraient être transcrits par l'ARN polymérase III comme le sont les tARN et U6snARN. Des études ont confirmé ce postulat en identifiant des éléments de répétitions associés à l'activité de la ARN polymérase III en

amont de certaines séquences codantes pour des miARN (Borchert et al., 2006). Cependant, dans la majorité des cas, la transcription des gènes des miARN est effectuée par l'ARN polymérase II également responsable de la transcription des ARNm (Lee et al., 2004). Ainsi, comme les autres gènes transcrits par l'ARN polymérase de classe II, certains pri-miARN vont avoir des modifications post transcriptionnelles telles que l'ajout de la cape en position 5' et de la queue poly A. Ces modifications ne sont cependant pas essentielles aux procédés de maturation. Après transcription, la séquence ribonucléique obtenue se distingue des autres ARN par une structure tige boucle flanquée de deux segments basaux non appariés essentiels à la maturation (Han et al., 2006).

#### **b) La première coupure par le microprocesseur Drosha – DGCR8**

Une fois transcrit, le pri-miARN est pris en charge dans le noyau par le microprocesseur en vue de réaliser la première coupure (Fig 9). Ce complexe protéique est un hétéro trimère composé de Drosha et deux protéines DGCR8. Une fois assemblé, le complexe prend une forme allongée permettant la prise en charge de toute la structure tige boucle du pri-miARN (Kwon et al., 2016). La protéine Drosha se lie au pri-miARN au niveau de la liaison entre la tige et les segments basaux non appariés. Les protéines DGCR8 vont, elles, se lier à la tige du pri-miARN (Nguyen et al., 2015). Ce positionnement met les deux sites catalytiques de Drosha à 11 paires de bases des segments basaux non appariés. Le pri-miARN est alors clivé en pre-miARN d'environ 60 nt qui garde sa boucle et une tige de 22pb avec une extrémité non appariée. Cette étape ne concerne pas les miARN appelés « mirtrons » dont la séquence est contenue dans un intron et dont l'épissage donne directement une structure pre-miARN (Fig 9).

### **1.3.2.2. Export nucléaire et seconde coupure**

#### **a) Exportine 5-Ran GTP**

Après la première coupure, le pre-miARN est exporté hors du noyau pour poursuivre sa maturation. Le transport au travers des pores nucléaires est actif et fait intervenir un système protéique : exportine 5 – Ran GTP. La liaison entre l'exportine 5 et le pre-miARN est permise par les phosphodiesteres présents au niveau des 2 nucléotides à l'extrémité 3' résultant de la coupure par Drosha et est stabilisée par des liaisons hydrogènes (Fig 9).

#### **b) Rôle de Dicer 1 dans la maturation des miARN**

Une fois libéré dans le cytoplasme, le pre-miARN est pris en charge par une seconde ARNase de type III appelée Dicer 1 qui retire la boucle pour donner le miARN mature double brin (Fig 9). Le maintien du pre-miARN par Dicer 1 est permis par des interactions électrostatiques avec le domaine dsRBD et le domaine PAZ à l'extrémité de Dicer 1. La distance à laquelle le pre-miARN est clivé par rapport à sa boucle est déterminée par l'écart entre deux domaines de Dicer 1 : le domaine PAZ et le domaine catalytique séparés de 65 Angström. Cette

distance correspond à une hélice d'ARN double brin de 25-27pb, ce qui est la longueur du miARN mature (MacRae et al., 2007).

### **1.3.2.3. Prise en charge du miARN mature**

Après le deuxième clivage, le miARN mature double brin est pris en charge par le complexe protéique pré-RISC (pour *RNA Inducing Silencing Complex*) qui assure la dernière étape de maturation du miRNA (Fig 9).

#### **a) Les protéines Argonautes et le chargement du miARN**

Après la seconde coupure par Dicer 1, un pré-complexe RISC est constitué à partir du miARN double brin, de Dicer 1 et des protéines Argonautes (Ago) (Gregory et al., 2005). Le miARN est alors transféré activement par hydrolyse d'ATP de la protéine Dicer 1 à Ago dans le complexe pre-RISC (Fig 9). Chez les mammifères, 4 iso-formes de la protéine Ago sont retrouvées : Ago1-4 et chaque iso forme peut prendre en charge les miARN indifféremment à l'exception des miARN-182, 222 et 223\* qui sont préférentiellement associés à une iso forme (Burroughs et al., 2011; Meister, 2013). Les iso-formes 1-2-3 sont retrouvées en quantités similaires dans les tissus alors qu'Ago 4 est particulièrement retrouvée dans les gonades où elle joue un rôle dans la spermatogénèse (Modzelewski et al., 2012; Petri et al., 2011). De façon intéressante, seul Ago2 possède une activité catalytique des ARN double brin bien que les domaines nécessaires à cette fonction soient retrouvés dans les autres iso-formes (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004).

#### **b) Le choix du brin guide et la sortie du brin passager**

Lorsque le miARN est positionné, la protéine Ago sélectionne un brin appelé le brin guide selon plusieurs paramètres et l'autre brin, appelé le brin passager, est détruit (Fig 9). Le premier facteur déterminant le choix du brin guide est la stabilité des 4 premiers nucléotides de l'extrémité 5' phosphate du miARN. L'extrémité 5' la moins stable du miARN double brin est préférentiellement chargée par la protéine Ago (Parker et al., 2005; Suzuki et al., 2015). De manière générale, le brin guide possède un uracile terminal en 5' et un excès de purine (A/G), à l'inverse le brin passager possède une cytosine terminale en 5' et un excès de pyrimidine (U/C) (Hu et al., 2009). La présence d'une liaison hydrogène entre le brin et la protéine Ago peut également être une structure favorisant le choix du brin en brin guide (Krol et al., 2004; Schwarz et al., 2003) revue (Meijer et al., 2014). Enfin, les modifications post transcriptionnelles telles que l'ajout d'une cape 5' par la ARN poll II ou l'ajout en 3' de nucléotides peuvent également influencer le choix du brin (Martí et al., 2010; Xie et al., 2013; Zhou et al., 2012). Une mutation de la séquence codant pour le miARN peut donc être à l'origine d'un changement lors du choix du brin et peut conduire à une pathologie comme cela est le cas pour le miARN-133a-5p conduisant à une fibrillation atriale (Ohanian et al., 2013). Des protéines peuvent également avoir un effet sur la détermination des brins guides et passagers. En effet, il apparait que lorsque Dicer 1 et TRBP/PACT forment un complexe avec

Ago2 les caractéristiques thermodynamiques du complexe formé (ARN et protéines) sont plus importantes que l'extrémité 5' (Fig 9) (Noland and Doudna, 2013). Enfin, l'iso-forme d'Ago peut être déterminante comme cela est le cas pour Ago3 sur le choix du miARN let-7a (Winter and Diederichs, 2013). Lorsque le brin guide est déterminé, la protéine Ago sépare progressivement les 2 brins du miRNA (Kawamata et al., 2009, 2011; Kwak and Tomari, 2012).

#### **1.3.2.4. Régulation post-transcriptionnelle**

Une fois formé, le miRNA chargé dans complexe pré-RISC reconnaît l'ARNm au niveau de séquences principalement situées dans le 3'UTR de l'ARNm. Il est également possible de trouver des sites de reconnaissances au niveau du 5'UTR ou de la séquence codante de l'ARNm (Lytle et al., 2007). A l'inverse des siARN, les miARN s'apparient sur seulement 7-8 nt. Ces sites sont appelés les 7-mer seed et les 6-mer seed pour respectivement des appariements de 7 nucléotides et 6 nucléotides entre le miARN et l'ARNm. Lorsque la liaison entre le miARN et l'ARNm est établie, le complexe recrute un ensemble de protéines formant le complexe RISC. Ce complexe RISC peut alors réguler l'expression des ARNm selon 3 processus (Fig 9) (Iwakawa and Tomari, 2015) :

##### **a) Le clivage endonucléique de l'ARNm**

La liaison entre le miARN et l'ARNm messenger donne une structure ARN double brin. Cette structure peut être clivée par le domaine ARNase H uniquement présent sur la protéine Ago2 (Meister et al., 2004). Cependant ce procédé tend à être minoritaire chez les eucaryotes du fait de l'appariement de l'ARNm par le miARN sur seulement 7-8 nucléotides (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

##### **b) La désadénylation de la queue poly A et le retrait de la cape 5' de l'ARNm**

La cape 5' et la queue poly sont des structures assurant la stabilité des ARNm, le transport et la traduction. Pour ce mécanisme, les protéines Ago recrutent séquentiellement des protéines conduisant au retrait de la queue poly A puis de la cape 5' (Braun et al., 2011; Christie et al., 2013; Fabian et al., 2009, 2011) (Behm-Ansmant et al., 2006; Chu and Rana, 2006; Pillai et al., 2005; Shih et al., 2011). Le retrait de ces structures conduit à la dégradation progressive de l'ARNm depuis l'extrémité 5' à 3' (Braun et al., 2012).

##### **c) Le blocage de la traduction**

Le retrait de queue poly A et de la cape 5' par RISC est suffisant pour bloquer le recrutement des éléments intervenants dans la traduction (pour revue : Jackson et al., 2010). Cependant, plusieurs études suggèrent qu'il existe un lien direct entre le complexe RISC et la machinerie de traduction notamment lors de l'initiation de la traduction de l'ARNm cible et de la formation du complexe ribosomal (Chendrimada et al., 2007; Humphreys et al., 2005; Wang et al., 2008).

### **1.3.3. Rôle non canonique de Dicer 1**

La fonction la mieux caractérisée de Dicer 1 est la maturation des miARN dans le compartiment cytoplasmique des cellules. Cependant, il apparaît que cette protéine peut également être localisée dans le noyau grâce à, d'une part son domaine de liaison aux ARN doubles brins ou dsARN (pour *double strand*) qui agit comme site non canonique de localisation nucléaire, et d'autre part à la phosphorylation de la protéine qui induit sa translocation dans le noyau (Ando et al., 2011; Burger et al., 2017; Doyle et al., 2013). Dans le noyau, Dicer 1 aurait plusieurs fonctions. La première fonction est le maintien du taux de dsARN à un niveau physiologique (White et al., 2014). En effet, l'absence de Dicer 1 entraînerait l'augmentation de ces dsARN ce qui est détecté par la cellule comme une infection virale entraînant l'induction de l'apoptose via la voie des interférons de type I (Alexopoulou et al., 2001; Honda et al., 2003). La seconde fonction est le rôle de Dicer 1 dans la réparation de l'ADN (Burger et al., 2017). Certains dommages, comme les coupures de l'ADN entraînent la transcription de dsARN. Dicer 1 se localise sur ces lieux de coupures pour diminuer la quantité des dsARN et recruter des protéines de réparation de l'ADN comme 53BP1 et MDC1 (Burger et al., 2017). Enfin la dernière fonction non canonique de Dicer 1 découverte à ce jour, est son rôle dans la régulation épigénétique (White et al., 2014). Dicer 1 est capable d'interagir avec des régions spécifiques de l'ADN incluant des promoteurs, des gènes et des séquences inter géniques. Une fois lié à l'ADN, Dicer 1 peut promouvoir la formation de marques épigénétiques grâce aux dsARN et à la protéine Ago1.

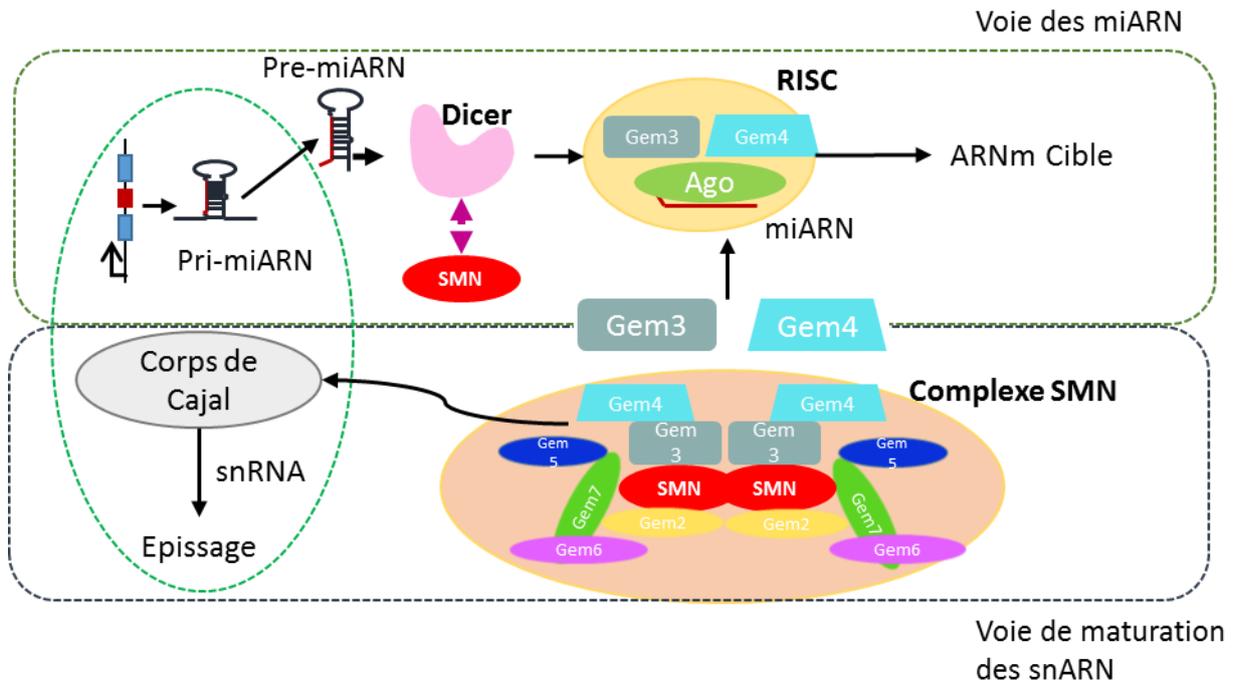
### **1.3.4. Rôle de la voie de biogenèse des miARN dans la physiopathologie de la SMA**

#### **1.3.4.1. Interactions entre SMN et les enzymes de maturation des miARN**

Un ensemble de données indique qu'un déficit en SMN pourrait perturber la voie de biogenèse des miRNA, amenant à l'hypothèse qu'une dérégulation des miRNA pourrait contribuer à la physiopathologie de la SMA comme cela a été suggéré dans d'autres pathologies neuromusculaires comme la sclérose latérale amyotrophique (Emde et al., 2015; Haramati et al., 2010).

Tout d'abord, des expériences de co-immunoprécipitation ont mis en évidence une interaction protéique entre SMN et Dicer 1, suggérant un possible rôle de SMN dans l'étape de maturation cytoplasmique des miRNA (Fig 10) (Joshi et al., 2013). De même, les protéines Gemines 3-4 présentes au sein du complexe SMN interagissent également avec la protéine Ago2 au sein du complexe RISC (Mourelatos et al., 2002). Les auteurs de cette étude suggèrent également que le domaine hélicase présent sur Gemine 3 pourrait lui permettre d'intervenir durant la maturation des miARN et également lors de la reconnaissance de l'ARNm cible par le complexe RISC (Fig 10). Ainsi, on peut supposer qu'un déficit en SMN pourrait perturber l'équilibre du complexe SMN mais également indirectement celui du complexe RISC et par conséquent l'étape de maturation finale des miRNA.

Enfin, les MN de souris SMA très sévères (hSMN2) en culture sont caractérisés par une hyperexcitabilité entraînant l'augmentation de l'autophagie et la diminution de plusieurs protéines dont la protéine Drosha (Gonçalves et al., 2018). Cette diminution de Drosha pourrait donc également perturber la maturation de certains pri-miARN en pre-miARN (Gonçalves et al., 2018).



**Figure 10 : Interactions protéiques entre SMN et la voie de biogenèse des miARN.**

#### 1.3.4.2. Perturbation du profil d'expression des miRNA au cours de la SMA

Enfin, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont permis d'identifier plusieurs miARN dont l'expression est dérégulée sans que le mécanisme à l'origine ne soit connu. Jusqu'à ce jour, les miARN identifiés ont majoritairement un rôle sur la différenciation des cellules neuronales mais certains sont également impliqués dans les tissus musculaires (Tableau 7).

De façon intéressante, un KO du gène codant pour Dicer 1 après la naissance dans les MN conduit à l'apparition progressive d'un phénotype proche de la SMA incluant une perte des MN et la diminution de la survie des souris (Haramati et al., 2010). Ce phénotype est spécifique du KO de SMN dans les MN. En effet, le KO de Dicer 1 dans d'autres types de neurones (neurones striataux) ne conduit pas à perte de ces cellules montrant l'importance de cette voie pour la survie des MN (Cuellar et al., 2008).

### 1.3.5. Rôle des miARN dans la régulation des cellules satellites du muscle

Comme nous l'avons vu, la voie des miARN est un mécanisme important permettant la régulation de l'expression des gènes. Cette voie est donc au cœur de nombreux mécanismes de régulation particulièrement dans les CS. A l'âge adulte dans les CS en quiescence, le KO de Dicer 1 conduit à la déplétion des cellules en moins de 2 semaines (Cheung et al., 2012). Cette étude montre l'importance de la voie des miARN pour la survie des CS. En accord avec ces résultats plusieurs miARN sont identifiés comme contribuant au maintien des CS quiescentes : le miR489 dont la cible est un oncogène permettant l'entrée en prolifération (*Dek*) et le miR-31 qui bloque la transcription de l'ARNm de *Myf5* dans les granules ribonucléiques (Cheung et al., 2012; Crist et al., 2012). Les miARN contrôlent également à différents points les processus de prolifération et de différenciation des CS lors de la myogénèse post natale et la régénération. Durant la prolifération, les miR133a, 682 et 27a sont sur-exprimés et favorisent cet état notamment en diminuant l'expression de la myostatine et le facteur de réponse au sérum (Chen et al., 2006, 2011; Huang et al., 2012). Enfin, plusieurs miARN ont un rôle essentiel dans le passage de la prolifération à la différenciation. Tout d'abord, les miR206 et 486 dont l'expression est induite par MyoD, diminuent l'ARNm de *Pax7* permettant l'engagement des myoblastes vers la différenciation (Dey et al., 2011; Goljanek-Whysall et al., 2011; Rao et al., 2006). Egalement, le miR1 dont la séquence est située sur le même gène que le miR133 favorise la différenciation en ciblant l'ARNm de la désacétylase des histones 4 (HDAC4) (Chen et al., 2006). Du fait de leur rôle et de leur expression restreinte aux muscles squelettiques et striés, les miR1-133-206 et 486 sont classés dans un groupe appelé « myomir » (Kirby and McCarthy, 2013).

|                       | Rôle   | Expression dans la SMA  | Références                                       |
|-----------------------|--|---|--|
| miR-9                 | Régulateur de la fonction neuronale et de la différenciation                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Augmentation dans : cellules NSC34, fibroblastes transfectés par sh ARN contre SMN, fibroblastes de patients</li> <li>Diminution dans la moelle épinière de souris SMA sévère (hSMN2)</li> </ul> | (Catapano et al., 2016; Wang et al., 2014)       |
| miR-206               | Régulateur de la différenciation des myoblastes<br>Régénération des synapses neuromusculaires    | Augmentation dans les muscles et la moelle épinière de souris SMA sévère (Delta7)   | (Catapano et al., 2016; Valsecchi et al., 2015)  |
| miR-132               | Croissance des dendrites<br>Fonction synaptique<br>Néo vascularisation                           | Réduction dans la moelle (modèle murin Delta7)<br>Muscle niveau normal (modèle murin Delta7)<br>Niveau élevé dans le sérum (modèle murin Delta7 et patients SMA II)   | (Catapano et al., 2016)                          |
| miR-183               | Régulation de la croissance axonale  | Augmentation dans les fibroblastes, Neurones moteurs et corticaux dans les modèles murins SMA sévère (Delta7) et cellulaires  | (Gonçalves et al., 2018; Kye et al., 2014)       |
| miR-355-5p            | Différenciation et auto-renouveaulement des cellules souches embryonnaires murines               | Diminution dans les cellules souches neuronales de modèles murins et IPS de patients  | (Murdocca et al., 2016; Schoeftner et al., 2013) |
| miR-431               | Régulation de la myogenèse<br>Régulation de la croissance des neurites                           | Augmentation <i>in vitro</i> (cellules de patients)   | (Wertz et al., 2016; Wheeler et al., 2006)       |
| miR-375               | Induit l'acquisition du phénotype MN<br>Protège les MN de l'apoptose après les dommages de l'ADN | Diminution <i>in vitro</i> dans les MN de patient SMA (IPS)   | (Bhinge et al., 2016)                            |
| miR-2                 | Permet le développement neuronal et la fonction correcte de la JNM                               | Augmentation dans <i>C.elegans</i>  | (O'Hern et al., 2017)                            |
| miR-128               | Permet le développement neuronal et la fonction correcte de la JNM                               | Augmentation dans les cultures de MN de souris SMA très sévère (hSMN2)  | (O'Hern et al., 2017)                            |
| miR-146               | Fonction astrocytaire  | Augmentation dans les astrocytes d'un KO conditionnel de SMN dans ces cellules (seul miARN perturbé dans cette condition)   | (Sison et al., 2017)                             |
| miR-10a-5p/miR-10b-5p | Non décrit   | Diminution dans des cultures de MN SMA très sévère (hSMN2)  | (Gonçalves et al., 2018)                         |
| miR-218               |  |   |  |
| miR26a                |  |   |  |

**Tableau 7 : Liste des miARN dérégulés dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* de SMA.**



## II. Objectifs



L'amyotrophie spinale ou SMA est la principale cause de mortalité infantile liée à une maladie génétique avec une incidence de 1 sur 6000 à 10000 naissances (Kolb and Kissel, 2015). Cette maladie génétique autosomale récessive, est caractérisée par une perte progressive des motoneurones de la corne ventrale de la moelle épinière et par une atrophie musculaire qui conduisent à une paralysie et une mort prématurée dans les formes les plus sévères. La SMA est due à des mutations ou des délétions homozygotes dans le gène *Survival of Motor Neuron 1 (SMN1)* conduisant à un déficit en une protéine ubiquitaire appelée SMN. Chez l'homme, il existe un deuxième gène *SMN*, appelé *SMN2*, différant de *SMN1* uniquement par 5 nucléotides et en particulier une transition C→T au niveau de l'exon 7. Cette transition conduit à un l'exclusion de l'exon 7 dans 90% des transcrits et à la production d'une protéine tronquée instable SMN $\Delta$ 7. En revanche, 10% des transcrits provenant de *SMN2* permettent la production d'une protéine SMN fonctionnelle. Ainsi, chez les patients SMA, la protéine SMN est exclusivement produite par le gène *SMN2* dont le nombre de copies conditionne la sévérité de la maladie. Cependant, comment la réduction d'une protéine ubiquitaire conduit à la dégénérescence sélective des motoneurones, une caractéristique clé de la pathologie, reste mal compris.

Depuis l'identification du gène *SMN1*, de nombreux travaux de recherche se sont attachés à identifier les mécanismes d'action de la protéine SMN, en particulier dans les motoneurones. La première fonction identifiée et par conséquent la mieux caractérisée est son implication dans l'assemblage des snRNP et la maturation des ARNs (pour revue (Singh et al., 2017) suggérant que le déficit en SMN pourrait affecter l'épissage d'ARNm importants pour la fonction des MN. En effet, des défauts d'épissage d'ARNm codant pour des molécules impliquées dans la croissance axonale et la JNM ont été rapportés dans différents modèles animaux de SMA. Cependant, d'autres travaux suggèrent que ces défauts d'épissage ne seraient qu'une caractéristique assez tardive de la maladie (Baumer et al, 2009-Zhang et al., 2008). Depuis, de nombreuses études ont mis en évidence l'implication de SMN dans plusieurs autres fonctions cellulaires importantes telles que le transport axonal de certains ARNm, des vésicules pré-synaptiques et des mitochondries, le trafic vésiculaire pré-synaptique, le dynamisme du cytosquelette d'actine ou encore le métabolisme bioénergétique. Cependant, à ce jour aucune de ces fonctions n'a pu être identifiée comme étant l'unique déclencheur de la SMA.

Les travaux de l'équipe de Martine Barkats ont été précurseurs dans le traitement des maladies neuromusculaires en montrant notamment la capacité des vecteurs viraux scAAV9 (self-complementary Adeno-Associated Virus of serotype 9) à transduire efficacement les cellules du système nerveux central, dont les motoneurones, après injection par voie intraveineuse (Barkats, patent # 2007). Grâce à cette technologie, plusieurs équipes ont pu démontrer qu'une injection unique par voie systémique d'un vecteur scAAV9-*SMN1* chez un modèle murin sévère de SMA induit une remarquable augmentation de la survie des souris traitées ouvrant de nouvelles perspectives thérapeutiques (Dominguez et al., 2011; Foust et al., 2010; Valori et al., 2010). En effet, en 2014 un premier essai clinique basé sur l'injection

par voie systémique d'un vecteur scAAV9-SMN à des patients atteints de SMA de type I a été initié et a permis de confirmer l'effet thérapeutique sans précédent de cette stratégie (Mendell et al., 2017).

Cependant, bien que les résultats de cet essai clinique soient spectaculaires et particulièrement encourageants, les effets à plus longs termes d'un tel traitement restent incertains.

En effet, nos travaux récents et ceux d'autres équipes, ont révélé que l'effet thérapeutique du vecteur scAAV9-SMN n'était pas uniquement dû à la restauration de l'expression de SMN dans les MN mais également dans les tissus périphériques (Besse *et al.*, en préparation et Hua et al., 2011). De même, une restauration ciblée de SMN uniquement dans les MN (Gavrilina et al., 2008-Martinez et al., 2012-Paez-Colasante et al., 2013-Hua et al., 2011, 2015) ou encore l'inhibition de l'apoptose dans les MN de souris SMA (Van Alstyne et al., 2018) n'est pas suffisante pour préserver les fonctions neuromusculaires et la survie des souris SMA.

En accord avec ces résultats, de plus en plus de données de la littérature mettent en évidence que les tissus périphériques seraient aussi sensibles à la diminution de SMN, faisant de la SMA une maladie multi-systémique plutôt qu'une maladie des MN. Par conséquent, un traitement ne ciblant pas efficacement les tissus périphériques pourrait conduire à terme à l'apparition d'autres pathologies et notamment à la dégradation du système neuromusculaire.

Ainsi, bien que les MN soient sans aucun doute la principale cible de la pathologie, il apparaît indispensable de mieux comprendre l'implication des tissus périphériques dans la physiopathologie de la SMA afin de développer des stratégies thérapeutiques combinées visant à restaurer SMN et à préserver l'intégrité des autres tissus tout au long de la vie des patients.

Le muscle squelettique et les cellules souches musculaires appelées Cellules Satellites (CS) semblent être particulièrement affectés par la réduction de SMN. En effet, l'ablation ciblée de SMN dans les fibres musculaires grâce au modèle murin *Smn<sup>F7/F7</sup>; HSA-Cre* induit un phénotype musculaire de type dystrophique et une durée de vie réduite suggérant un rôle muscle-spécifique de SMN notamment dans la stabilité des fibres musculaires (Nicole et al., 2003). D'autre part, des défauts de myogenèse post-natale ont été observés chez les patients SMA et les modèles murins SMA (Martínez-Hernández et al., 2009; Soler-Botija et al., 2002; Hayhurst et al., 2012; Boyer et al., 2014). Enfin, la restauration de SMN sous le contrôle des promoteurs *Myf5* et *MyoD* dans les précurseurs myogéniques chez les souris SMA Delta7, améliore les fonctions motrices et la survie de ces souris (Martinez et al., 2012).

Cependant, en raison du lien étroit existant entre le tissu musculaire et les motoneurones, il est toujours difficile de savoir si le phénotype musculaire est dû uniquement à une réponse intrinsèque du muscle et de CS au déficit en SMN ou est la conséquence de la dégénérescence des MN. Ainsi, une meilleure compréhension du rôle de SMN dans le muscle et plus particulièrement dans les cellules souches musculaires pourrait être déterminante pour la

compréhension de la physiopathologie de la maladie et par conséquent pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les travaux de thèse se sont inscrits dans ce contexte, et avaient pour principaux objectifs :

- 1) Définir le rôle de SMN dans la régulation des cellules satellites musculaires
- 2) Evaluer un rôle potentiel des cellules satellites musculaires dans la physiopathologie de la SMA
- 3) Etudier les mécanismes moléculaires intervenant en aval de SMN dans la régulation des cellules satellites musculaires et plus particulièrement l'interaction entre SMN et la voie de biogenèse des miARNs, avec comme objectif final d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques au niveau de ces cellules.



### III. Matériel et méthodes



## Expérimentation *in vivo*

- Lignées de souris

Les souris C57BL/6J Pax7<sup>CreERT2/+</sup> (Lepper et al., 2009) générées par le laboratoire de C.Fan ont été fournies par le laboratoire de Frédéric Relaix. Les souris C57BL/6J *Smn*<sup>F7/F7</sup> (Frugier et al., 2000) générées par le laboratoire de J.Melki ont été obtenues de l'éleveur Jackson Laboratory. Les lignées ont été croisées pour obtenir une génération F1 Pax7<sup>CreERT2/+</sup>; *Smn*<sup>F7/+</sup>. La génération F1 a ensuite été croisée pour générer les 3 génotypes suivants : Pax7<sup>CreERT2/+</sup>; *Smn*<sup>+/+</sup>, Pax7<sup>CreERT2/+</sup>; *Smn*<sup>F7/+</sup> et Pax7<sup>CreERT2/+</sup>; *Smn*<sup>F7/F7</sup>. Les souris C57BL/6J Rosa26<sup>mTmG/+</sup> (Muzumdar et al., 2007) ont été données par l'équipe de Fabien Le Grand (U974 – centre de recherche en myologie) et ont été croisées avec les souris Pax7<sup>CreERT2/+</sup>; *Smn*<sup>+/+</sup> pour obtenir les 2 génotypes suivants : Pax7<sup>CreERT2/+</sup>; Rosa26<sup>mTmG/+</sup> et Pax7<sup>+/+</sup>; Rosa26<sup>mTmG/+</sup>. Les souris de la lignée hSMN2 (SMA sévère, Monani et al., 2000) ont été obtenues de l'éleveur Jackson Laboratory. Les animaux *Smn*<sup>+/+</sup>;hSMN2<sup>tg/tg</sup> ont été croisés pour obtenir les génotypes suivants : *Smn*<sup>+/+</sup>;hSMN2<sup>tg/tg</sup> (contrôles, WT), *Smn*<sup>+/-</sup>;hSMN2<sup>tg/tg</sup> et *Smn*<sup>-/-</sup>;hSMN2<sup>tg/tg</sup> (SMA). Sauf mention, les groupes expérimentaux sont composés par des mâles et des femelles. L'hébergement des souris se fait selon les normes en vigueur avec une alternance des cycles de lumières et obscurité de 12h et avec un accès à l'alimentation et l'hydratation *ad libitum*. L'ensemble des procédures détaillées dans la suite du document ont reçu un avis favorable du comité éthique de Sorbonne Université.

- Génotypage des souris

L'ADN est extrait à partir de biopsies par le kit d'extraction Bioline™ ou par du NaOH 10mM pour les souris hSMN2. Les biopsies sont chauffées pendant 15 minutes à 75°C puis pendant 10 minutes à 95°C dans les tampons fournis par le kit. Les PCR sont ensuite réalisées avec les primers listés dans le tableau 8 et avec le kit Kappa™ pour la présence des séquences de recombinaison flox autour de l'exon 7 du gène *Smn* (*Smn*<sup>F7/F7</sup>), par le kit Bioline™ pour la présence du transgène Pax7<sup>CreERT2/+</sup> et *mTmG* et par le kit ABM pour les souris hSMN2. Les produits de PCR obtenus sont migrés sur un gel d'agarose 2%-GelRed (bioline).

- Induction de la recombinaison

La recombinaison par la recombinase CreERT2 exprimée dans les lignées Pax7<sup>CreERT2/+</sup>; *Smn*<sup>F7/F7</sup> et Pax7<sup>CreERT2/+</sup>; *Smn*<sup>F7/F7</sup> a été induite par l'injection intrapéritonéale de 3mg de tamoxifène (Roche, solution mère 30mg/mL) pour 20g de poids pendant 4 jours consécutifs comme décrit précédemment (Hayashi and McMahon, 2002). L'injection a été réalisée sur des souris adultes âgées de plus de 2 mois.

- Protocoles de suivis des souris
  - Protocole d'homéostasie

Dès l'injection de tamoxifène, le poids des souris a été suivi de façon hebdomadaire. A partir de la 4<sup>ème</sup> semaine, la force de préhension des 4 membres et la coordination motrice

| Lignée  | Gène/transgène             | Primer forward                         | Primer reverse                             |
|---|----------------------------|--|--|
| <i>Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup></i> | <i>Smn<sup>F7/F7</sup></i> | AGA AGG AAA GTG CTC ACA<br>TAC AAA TT  | TGT CTA TAA TCC TCA<br>TGC TAT GGA G       |
|   | CreERT2                    | AGC AAT GCT GTT TCA CTG<br>GTT ATG CGG | AGT TGC TTC AAA AAT<br>CCC TTC CAC GGC CCG |
| <i>Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Rosa26-mTmG</i>         | GFP                        | GAC GTT GTG GCT GTT GTA GTT<br>G       | CGA GCT AAA CGG CCA CAA<br>GTT C           |
| <i>Smn<sup>-/-</sup>;hSMN2<sup>+/+</sup></i>        | SMN                        | WT/KO : TTT CTT CTG GCT<br>GTG CCT TT  | WT : CTC CGG GAT ATT<br>GGG ATT G          |
|   |                            |  | Ko : GGT AAC GCC AGG<br>GTT TTC C          |

**Tableau 8 : séquence des amorces utilisées pour le géotypage des différents modèles.**

des souris ont été évaluées toutes les semaines par le grip test (5 essais) et par rotarod (3 essais, 2 minutes de repos entre chaque essais) jusqu'à la semaine 11 après injection pour le grip test et 22 après injection pour le rotarod.

- Protocole d'exercice modéré

Quatre semaines après les injections de tamoxifène, les souris mâles incluses dans le protocole ont été évaluées de façon hebdomadaire. Durant ces semaines, la force des souris a été mesurée par grip test (5 essais consécutifs) immédiatement après un passage de 5 minutes sur un tapis de course réglé à une allure de marche (15cm/s). Deux jours après, les souris sont placées 2 minutes sur une grille retournée et, 15 minutes après, l'évaluation de la coordination motrice est faite sur le rotarod (3 essais avec incrémentation de la vitesse de 4 à 40 rotations par minute en 120 secondes, 2 minutes de repos sont laissées entre chaque essai).

| Protocole hebdomadaire   |  |
|--|--|
| J0   | J+2  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Course sur tapis : 5 min à 15 cm/s</li> <li>- Temps de repos : 0s</li> <li>- Grip test : 5 essais, temps de repos entre les essais : 0s.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Suspension sur grille retournée : 2 min</li> <li>- Temps de repos : 15 min</li> <li>- Rotarod : 3 essais avec incrémentation de la vitesse de 4 à 40 RPM sur 2 min, temps de repos entre les essais : 2 min.</li> </ul> |

**Tableau 9 : protocole hebdomadaire d'exercice modéré.**

### Purification des cellules satellites par cytométrie en flux

Après sacrifice par dislocation cervicale, les muscles sont prélevés, et émincés finement dans des boîtes de pétries, puis digérés par une solution de digestion contenant: Dispase II- 0,8 U/mL (Roche), Collagénase-100 µg/µL (Roche), MgCl<sub>2</sub> 5mM finale, CaCl<sub>2</sub> 0,4mM finale, Dnase 0.01mg/mL finale, pénicilline/streptomycine 1%, sérum d'albumine bovine 0.2% dilué

dans de l'HBSS, à 37°C avec agitation toutes les 15 minutes et jusqu'à digestion complète du muscle. Les cellules ont ensuite été filtrées sur tamis puis les globules rouges lysés (Lysis Buffer, BD). Pour la purification des cellules satellites, les cellules ont été marquées avec des anticorps couplés dirigés contre les marqueurs de surface suivants : CD45 (1/40, Tombo Bioscience), Ter119 (1/40, BD), CD34 (1/40, BD), Sca1 (1/40, BD) et  $\alpha$ 7-intégrine (1/20, R&D system), pendant une heure à 4°C. Après lavage par de l'HBSS, un marqueur de viabilité, le 7AAD (BD), a été ajouté et les cellules à nouveau filtrées avant d'être passées dans le cytomètre de flux. Les cellules satellites ont été purifiées à partir de la population CD45<sup>-</sup>/Ter119<sup>-</sup>/Sca1<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/ $\alpha$ 7int<sup>+</sup> comme précédemment décrit (Didier et al., 2012). Les cellules ont été recueillies dans une solution de sérum de veau foetale dilué au 5<sup>ème</sup> dans de l'HBSS. Tous les tris ont été réalisés par la plateforme CYPs (Pitié-Salpêtrière, Paris).

### Liste des anticorps

Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-Pax7 (souris IgG1, 1/100, Santa Cruz Technology), MyoD (lapin, 1/100, Santa Cruz Technology), Laminine (lapin, 1/250, Sigma Aldrich), Dicer 1 (lapin, 1/200, Abcam), BA-D5 (MyHc-1, souris IgG2b, 1/5, Developmental Studies Hybridoma [DSHB]), SC-71 (MyHC-IIa, souris IgG1, 1/10, DSHB), BF-F3 (MyHC-IIb, souris IgGM, 1/5, DSHB), 6H1 (MyHC-IIx, souris IgGM, 1/10, DSHB), GFP (lapin, 1/500, Abcam), ChAT (chèvre, 1/50, Milipore), NeuN (souris IgG1, 1/300, Millipore), SMN (souris IgG1b, 1/200, BD), anticorps de chèvre anti immunoglobulines de souris IgG1 couplé à la biotine (1/500, Jackson), Streptavidine couplée à la cyanine 3 (1/1250, Jackson), anticorps de chèvre anti anticorps de lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (1/500, Life technology), anticorps d'âne anti anticorps de chèvre conjugué à l'Alexa Fluor 488 (1/750, Life technology), anticorps de chèvre anti anticorps de lapin couplé à la Cyanine 5 (1/500, Jackson), anticorps de chèvre anti anticorps de souris IgG2b couplé à l'Alexa Fluor 405 (1/500, Life technology), anticorps de chèvre anti anticorps de souris IgGM couplé à la Cyanine 3 (1/500, Jackson), anticorps de chèvre anti anticorps de souris IgG1 conjugué à l'Alexa Fluor 594 (1/500, Life technology), DAPI (1/5000).

### Immunofluorescence

- Immunomarquage des cellules satellites et de Dicer 1 sur sections de muscles

Les sections de muscles humains et murins ont été fixées pendant 20 minutes dans du paraformaldéhyde 4% et perméabilisées dans du méthanol froid (-20°C). Une étape de démasquage des antigènes a été réalisée pour optimiser le marquage des protéines nucléaires telles que les facteurs de transcription (Pax7, MyoD) par deux bains d'acide citrique (0,01 M pH6) chaud (90°C). Les coupes ont ensuite été saturées pendant 2 heures avec de la albumine sérique bovine à 5% diluée dans du PBS et une incubation de 30 minutes avec des fragments F(ab) de chèvre anti-souris a été faite pour bloquer les chaînes lourdes des anticorps présents dans les tissus. Les sections ont été incubées sur la nuit avec le premier anticorps primaire dilué dans de la BSA 5% sans IgG à 4°C (anticorps de lapin anti-MyoD, ou Dicer 1) dans une chambre humide. Puis, les sections ont été lavées au PBS avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire (chèvre anti lapin couplé à l'Alexa 488) pendant 1 heure à température

ambiante. Après 3 lavages au PBS, les sections ont ensuite été incubées avec les anticorps anti-laminine (lapin, seulement pour le marquage Pax7/MyoD et non Pax7/Dicer 1) et Pax7 (IgG1 souris) dilués dans de la BSA 5% pendant 2h à température ambiante puis lavées et incubées avec les anticorps secondaires pendant une heure (chèvre anti-lapin couplé à la Cyanine 5 et chèvre anti-souris couplé à la biotine). Pour finir, les sections ont été incubées pendant 30 minutes avec la streptavidine couplée à la Cyanine 3 et les noyaux ont été marqués avec du DAPI pendant 2 minutes. Les lames sont montées avec du fluoromount-G® SouthernBiotech™ et recouvertes par une lamelle de verre.

- **Typage des fibres musculaires sur sections**

Après saturation et blocage des sites aspécifiques par de la BSA, les sections de muscles fraîchement coupées ont été incubées sur la nuit avec un anticorps anti-laminine (lapin) et soit par un anticorps anti myosine IIx (IgM) soit par un anticorps anti-myosine IIb (IgM). Les lames ont ensuite été incubées avec des anticorps secondaires (chèvre anti lapin couplé à l'Alexa 488 et chèvre anti-souris couplé à l'Alexa 647). Après 3 lavages au PBS, les sections de muscles ont été incubées avec les anticorps anti-myosine I (IgG2b) et anti-myosine IIa (IgG1) pendant 2 heures, puis avec les anticorps secondaires : chèvre anti-souris (IgG2b) couplé à l'Alexa 350 et chèvre anti-souris (IgG1) couplé à la cyanine 3 pendant 1 heure. Les lames ont été montées avec du fluoromount-G® SouthernBiotech™ et recouvertes par une lamelle de verre.

- **Immunomarquage de SMN sur cellules satellites purifiées**

Après avoir été triées dans une solution de sérum de veau foetal dilué au 5<sup>ème</sup>, les cellules satellites ont été fixées pendant 5 minutes dans de la PFA 4%. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 10 minutes dans du PBS-Triton à 0.1% puis une heure dans du PBS-T/BSA 5%. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre SMN (IgG1 souris, BD) puis avec l'anticorps de chèvre anti anticorps de souris Ig1 biotinilé pendant une heure. Les cellules ont enfin été incubées pendant 30 minutes avec la streptavidine couplée à la Cyanine 3 et les noyaux colorés par le DAPI. Les cellules ont finalement été déposées entre une lame et une lamelle de verre fixées par du fluoromount.

- **Immunomarquage des motoneurons alpha et gamma sur sections de moelles**

Après anesthésie profonde, les souris ont été perfusées avec une solution de PBS et de PFA 4% avant dissection des organes. La colonne vertébrale est ensuite post-fixée pendant au moins 24h à 4°C puis déshydratée dans du sucrose 30% jusqu'à isolation et congélation de la moelle dans de l'isopentane. Les sections de 14µm réalisées au cryostat ont été fixées pendant 30 minutes par de la PFA 4% et perméabilisées par du PBS-Triton 0,1% (PBS-T). Le marquage ChAT a été optimisé par un démasquage des antigènes comme indiqué pour Pax7 et MyoD. Les sections ont ensuite été saturées par une solution BSA 5% et de sérum de chèvre dans du PBS-T pendant 2h. Les chaînes lourdes des anticorps tissulaires ont été bloquées pendant 30 minutes par des fragments F(ab) de chèvre anti-souris. Les sections ont ensuite été incubées

avec l'anticorps de chèvre anti ChAT sur la nuit à 4°C dans une chambre humide. Après lavages au PBS, les sections ont été incubées avec l'anticorps secondaire (anticorps d'âne anti anticorps de chèvre couplé à l'Alexa 488) pendant 1h à l'obscurité. Après lavages au PBS, les sections de moelles ont été incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre NeuN (IgG1 souris Millipore) dilué dans la BAS 5% pendant 2h à température ambiante, puis avec l'anticorps secondaire chèvre anti-souris (IgG1) couplé à la cyanine 3 pendant 1h. Les noyaux ont été marqués par le DAPI et les lames montées avec du fluoromount.

- **Analyse des jonctions neuromusculaires**

Les muscles prélevés ont été fixés sur la nuit dans une solution de PFA 4% à 4°C puis cryo-protégés dans du sucrose à 30% dilué dans du PBS pendant 24h avant congélation. Les marquages des JNM ont été réalisés par Julien Messéant et Stephanie Bauché (U974- Centre de Recherche en Myologie) d'après les protocoles précédemment publiés (Messéant et al., 2015). Brièvement, les fibres isolées sont successivement perméabilisées par du PBS-T 0.1% et incubées pendant 4h dans une solution de blocage (3% BSA, 5% de sérum de chèvre dilués dans du PBS-T 0.1%). Les anticorps primaires dirigés contre les Neuro Filaments et la Synapsine ont été incubés sur la nuit à 4°C. Les anticorps secondaires (anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la Cyanine 3) et l' $\alpha$ -bungarotoxine couplée à l'Alexa Fluor 488 ont été incubés sur la nuit à 4°C.

### **Coloration des motoneurones par la méthode de Niels**

Les sections de moelles épinières conservées à -80°C ont été sorties 1h avant le début du protocole et réhydratées par deux bains de 5 minutes dans du PBS. Les sels ont été lavés par un bain d'eau milliQ d'une minute, puis les sections ont été colorées pendant 15 minutes dans la solution de coloration (acétate de crésyl violet 0.1% m/v, acide acétique glacial 0.25% v/v dans de l'eau milliQ). L'excédent de colorant a été retiré par 2 bains successifs de 5 minutes dans de l'eau milliQ. Les sections ont ensuite été progressivement déshydratées dans 3 bains de 3 minutes d'éthanol à concentration croissante (90%, 95%, 100% 2x) puis fixées dans 3 bains de 3 minutes dans le xylène 100%. Les lames ont enfin été montées avec une lamelle et un milieu de montage.

### **Analyses histologiques**

Toutes les images ont été analysées par le logiciel ImageJ. Les scans des coupes de muscles pour le typage et la mesure de l'aire des fibres ont été reconstruits sur le logiciel Métamorphe avant analyse. Le typage des fibres, la quantification du nombre de motoneurones (IF et coloration) et de la recombinaison de SMN ont été réalisés manuellement. L'aire des fibres a été mesurée par la macro MuscleJ fonctionnant sous ImageJ comme détaillé dans l'article associé (Mayeuf-Louchart et al., 2018).

### **Extraction des ARN à partir de cellules**

Les culots secs de cellules ont été lysés dans le tampon de lyse du kit mirVana™ miRNA isolation. Les ARN et les protéines ont été séparés par l'ajout d'un volume de chloroforme. De l'éthanol 100% (25% du volume final) a été ajouté à la fraction supérieure (aqueuse) pour précipiter les ARN. Les ARN courts (< 200nt) et longs (>200nt) ont été séparés par une première colonne. Le filtrat contenant les ARN court enrichi en éthanol (55% du volume final) a ensuite été passé sur une seconde colonne. Les colonnes ont été lavées et éluées par 100µL d'une solution incluse dans le kit.

La concentration des ARN et le rapport acide nucléique/protéine ont été déterminés sur un nanodrop Devonix™.

### RT-qPCR

- ARN totaux et longs (>200 nucléotides)
  - Reverse transcription

Les quantités d'ARN ont été ajustées pour être à des concentrations identiques dans de l'eau RNase free selon les limites données par le protocole d'Invitrogen™. Les ARN ont ensuite été chauffés pendant 10 minutes à 70°C avec 50ng d'amorces hexamériques aléatoires. Le mélange réactionnel contenant : le tampon réactionnel, le DTT (0,1M), les désoxy-nucléotides-triphosphate (10mM) et la Superscrit reverse transcriptase II® (100U) et l'eau sans Rnase, a été ajouté pour un volume final de 20µL.

- RT-qPCR

Les qPCR sur les ARN longs ont été réalisées selon le protocole du kit LightCycler® 480 SYBR Green de Roche™ sur un thermocycleur Roche LightCycler 480 II. Les amorces ont été utilisées à une concentration finale de 0.3µM. La température d'hybridation était de 60°C.

|             | Forward (5' – 3')    | Reverse (5' – 3')    |
|-------------|----------------------|----------------------|
| <b>Po</b>   | CTCCAAGCAGATGCAGA    | ATAGCCTTGCGCATCATGGT |
| <b>Pax7</b> | AGGCCTTCGAGAGGACCCAC | CTGAACCAGACCTGGACGCG |
| <b>MyoD</b> | AGGCCTTCGAGAGGACCCAC | CTGAACCAGACCTGGACGCG |
| <b>Ki67</b> | AGCTCCTGCCTGTTTGAAG  | TCAGCCTCACAGCATCT    |

**Tableau 10 : séquence des amorces utilisées pour la qPCR.**

ARN courts (<200 nucléotides)

- Reverse transcription

Les quantités d'ARN ont été ajustées à l'identique pour être comprises entre 1 et 10ng dans de l'eau RNase free (volume final 5 µL) selon le protocole de TaqMan MicroRNA Reverse

Transcription Kit® de Applied Bioscience™. Le mélange réactionnel contenant : 3,8 Unités d'inhibiteurs de RNase, 50 Unités de Multiscribe™ Reverse Transcriptase, et 15 µmoles de dNTP ainsi que 3µL d'amorces spécifiques à chaque miRNA ont été ajoutés pour un volume final de 15µL.

- qRT-PCR

La quantification de l'expression des miRNA a été faite par l'ajout de 1.33µL du produit de reverse transcription au mélange réactionnel contenant le mix TaqMan et les amorces spécifiques à chaque miRNA (TaqMan Assay®). Le suivi de la réaction d'amplification a été fait sur un thermocycleur Applied Bioscience StepOne plus.

### **Analyse transcriptomique**

- Mesure de l'expression des miRNA

L'analyse transcriptomique a été réalisée par la plateforme de génomique de l'institut Curie sur une puce miR V4 créé par Affymetrix permettant l'identification de 1908 miRNA matures murins et 1255 pré-miRNA. L'hybridation de l'ensemble des ARN a été réalisée pendant le même essai, après vérification de leur état (agilent bioanalyser) et marquage (kit Affymetrix).

- Analyse des données

L'analyse des données brutes et leur normalisation ont été effectuées par Nicolas Cagnard sur la plateforme de bio-informatique de l'université Descartes à l'aide d'un code utilisable sous R.

### **Analyses statistiques**

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées sous le logiciel GraphPad Prism. Les tests statistiques post hoc ont été choisis en fonction du type de données à traiter. Le seuil de significativité statistique a été fixé pour une *p.value* inférieure à 0.05.



## IV. Résultats



#### 4.1. Etude du rôle de SMN dans la fonction des cellules satellites musculaires

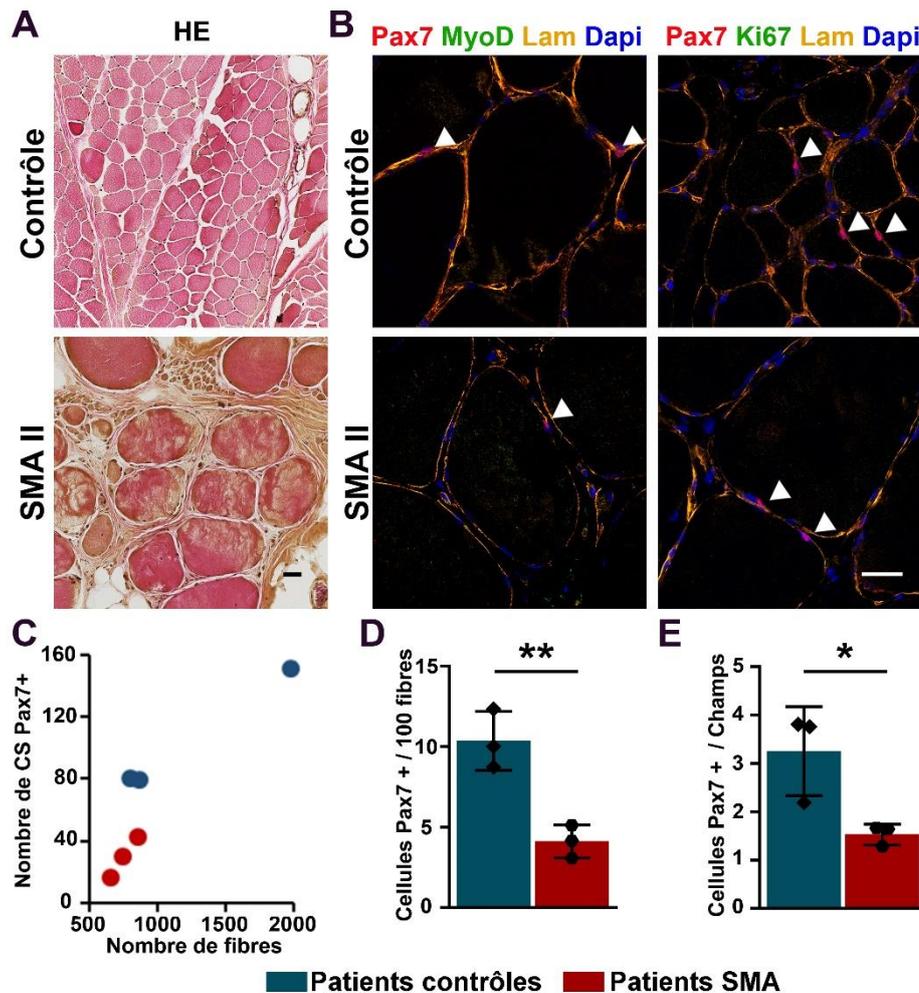
##### 4.1.1. Les muscles de patients SMA présentent une réduction du nombre de cellules satellites Pax7+

Très tôt dans la chronologie des études sur la SMA, des observations en microscope électronique ont rapporté une dérégulation du nombre de CS dans les muscles de patients SMA type I par rapport à des muscles néonataux contrôles (van Haelst, 1970; Saito, 1985). Ces observations ont récemment été corroborées par une étude montrant une augmentation significative du nombre de CS Pax7+ dans les muscles de patients SMA de type I néonataux suggérant un défaut de la myogenèse (Martinez et al., 2012). Afin de mieux comprendre le rôle de SMN dans la régulation des CS musculaires et d'évaluer une possible implication de ces cellules dans la physiopathologie de la SMA, nous avons dans un premier temps quantifié les CS sur des biopsies de patients SMA type II et contrôles âgés de 10 à 16 ans, obtenues grâce au service de banque de tissus de l'Association Institut de Myologie (AIM-MyoBank) à la Pitié Salpêtrière (Tableau 9). L'objectif de cet échantillonnage était de pouvoir caractériser la population de CS à un stade plus tardif de la myogenèse post natale, afin d'évaluer l'impact du déficit en SMN sur l'établissement du pool de CS dans les muscles (Tableau 9).

| Patients n° | Âge    | Sexe  | Muscle prélevé |
|-------------|--------|-------|----------------|
| CTR-1       | 10 ans | Homme | Dorsal         |
| CTR-2       | 13 ans | Femme | Dorsal         |
| CTR-3       | 14 ans | Femme | Dorsal         |
| SMA-1       | 16 ans | Femme | Para vertébral |
| SMA-2       | 13 ans | Femme | Lombaire       |
| SMA-3       | 14 ans | Homme | Para vertébral |

**Tableau 11 : Caractéristiques des patients inclus dans l'étude.** L'ensemble des biopsies ont été prélevées lors d'une opération chirurgicale consistant à fusionner les vertèbres pour maintenir la colonne. Les patients contrôles (CTR) sont des patients ne présentant pas de maladie neuromusculaire.

Comme cela est décrit dans la littérature, l'analyse histologique des biopsies colorées à l'hématoxyline/éosine (HE) révèle une grande hétérogénéité de la taille des fibres dans les biopsies des patients SMA II avec des groupes de fibres atrophiques et hypertrophiques en comparaison aux muscles des patients contrôles (Fig 11A). De plus, ces analyses montrent l'absence de signes pathologiques dans les muscles des patients contrôles. A l'inverse, les muscles de patients SMA présentent une fibrose marquée, une accumulation de tissu adipeux interstitiel et la présence de noyaux centraux et de fibres nécrotiques, signes d'un processus de dégénérescence/régénération. Grâce à ces biopsies nous avons ensuite caractérisé la population des CS Pax7+ par immunofluorescence (flèches, Fig 11B). Compte tenu de l'hétérogénéité des biopsies musculaires humaines, nous avons compté au minimum 650 fibres par échantillon (Fig 11C).



**Figure 11 : Le pool de CS Pax7+ est réduit dans les muscles des patients SMA type II. (A-B)** Photo représentative de coupes transversales de muscles des patients contrôles et SMA type II coloré par hématoxyline/éosine (HE, A), ou immunomarquées (B) pour Pax7 (rouge), MyoD/Ki67 (vert, respectivement images du milieu et de droite) et par la Laminine (orange). Les noyaux sont colorés par le DAPI. **(C)** diagramme du nombre de CS en fonction du nombre de fibres comptées par patient **(D-E)** Histogrammes montrant le nombre de cellules Pax7+ normalisé par 100 fibres **(D)** et par champs **(E)** quantifié à partir de sections comme montrées en **(B)**. Les valeurs indiquées sont la moyenne +/- s.e.m de trois quantifications indépendantes par groupe de patients (Test de normalité de Shapiro-Wilk, Test de Student non apparié, avec \* $p < 0.05$  et \*\* $p < 0.01$ ). Les flèches indiquent les CS Pax7+. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

Nous avons dans un premier temps normalisé le nombre de cellules Pax7+ par 100 fibres (Fig 11D). Nos résultats montrent une diminution statistiquement significative du nombre de ces cellules de 10 cellules Pax7+ /100 fibres pour les muscles CTR à 4 cellules pour les muscles SMA (\*\* $p < 0.01$ ). Du fait de la grande hétérogénéité de la taille des fibres dans les échantillons SMA, nous avons également normalisé le nombre de cellules Pax7+ par champs (Fig 11E). Comme nous l'observons pour le nombre de cellules Pax7+ / 100 fibres, le nombre de cellules Pax7+ par champs diminue également de façon statistiquement significative passant d'une moyenne de 3 cellules/champs pour les muscles CTR à une moyenne de 1,5 cellules/champs pour les muscles SMA type II (\* $p < 0.05$ ). De plus, nous avons réalisé des co-immunomarquages pour Pax7/MyoD et Pax7/Ki67. Nous n'avons observé aucune CS Pax7+ positive pour MyoD

ou Ki67 aussi bien dans les muscles CTR que dans les muscles SMA démontrant qu'à ce stade de la croissance post-natale les CS présentes sont majoritairement quiescentes (Fig 11B).

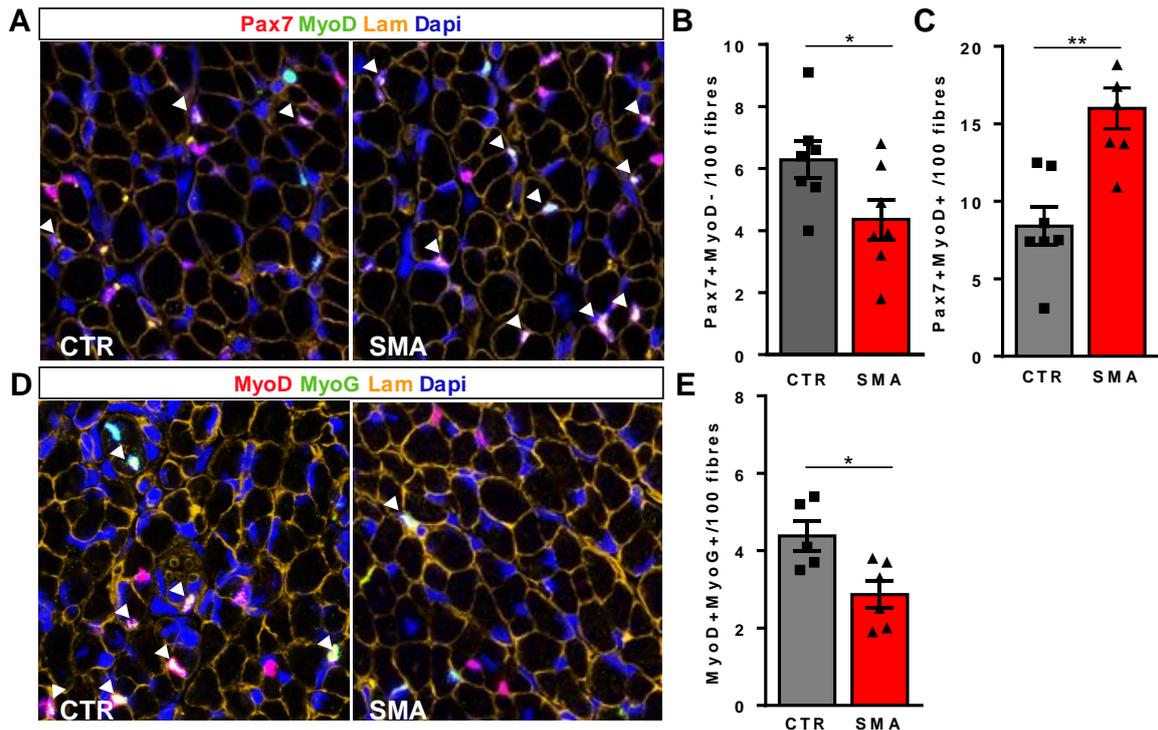
Nos analyses démontrent que le nombre de CS Pax7+ est diminué dans les muscles de patients SMA aux stades tardifs de la myogenèse post-natale, supportant l'hypothèse d'un rôle de SMN dans la régulation des CS musculaires. Cette diminution suggère que l'établissement et/ou le maintien du pool de CS sont compromis dans les muscles des patients SMA. Sur la base des observations antérieures réalisées sur des muscles de patients SMA et de souris SMA et de nos observations, nous supposons que cette diminution du nombre de CS Pax7+ pourrait résulter : (1) d'une altération de la capacité des CS déficientes en SMN à entrer en quiescence (2) d'une perte des CS par apoptose consécutive au déficit en SMN (3) d'un épuisement du pool de CS dû à des cycles répétés de dégénérescence/régénération (Fayzullina and Martin, 2014; Fidziańska et al., 1990; Hayhurst et al., 2012; Martínez-Hernández et al., 2009, 2014; Tews and Goebel, 1996).

#### **4.1.2. La myogenèse post-natale des souris SMA est perturbée**

Afin d'identifier les mécanismes sous tendant la diminution du nombre de CS dans les muscles de patients SMA, nous avons dans un premier temps caractérisé la myogénèse post-natale dans le modèle murin de SMA très sévère hSMN2.

Pour cela nous avons réalisé une analyse par immunofluorescence sur des sections de muscles tibialis antérieurs (TA) de souris SMA (*Smn*<sup>-/-</sup>;*hSMN2*) et contrôles (*Smn*<sup>+/+</sup>;*hSMN2*) âgées de 4 jours, immunomarquées pour Pax7 et MyoD (Fig 12A) ou MyoD et MyoG (Fig 12D). Nous avons quantifié le nombre de cellules Pax7+MyoD- (engagées vers la quiescence), Pax7+MyoD+ (activées) et MyoD+MyoG+ (différenciées) (Fig 12B-C-E). Nous avons observé une augmentation significative du nombre de cellules activées (Pax7+MyoD+) associée à une diminution significative du nombre de cellules engagées vers la quiescence (Pax7+MyoD-) et de cellules différenciées (MyoD+MyoG+) dans les muscles des souris SMA comparé aux muscles contrôles.

En accord avec nos observations sur les muscles des patients SMA, ces données démontrent que le déficit en SMN affecte la myogenèse post-natale, confortant notre hypothèse selon laquelle (1) SMN pourrait jouer un rôle spécifique dans la régulation des cellules satellites musculaires et plus particulièrement dans l'engagement des CS vers la quiescence ou vers la différenciation, (2) la diminution du nombre de CS Pax7+ dans les muscles de patients SMA pourrait au moins en partie résulter d'une diminution de la capacité des CS déficientes en SMN à s'engager vers la quiescence compromettant ainsi la constitution du pool de CS quiescentes au cours de la myogenèse post-natale. Cependant, le muscle étant en relation étroite avec les MN par l'intermédiaire des JNM, ces expériences ne nous permettent pas de savoir si les défauts observés au niveau des CS musculaires sont directement dus à un rôle muscle spécifique de SMN ou sont la conséquence de l'atteinte des MN.

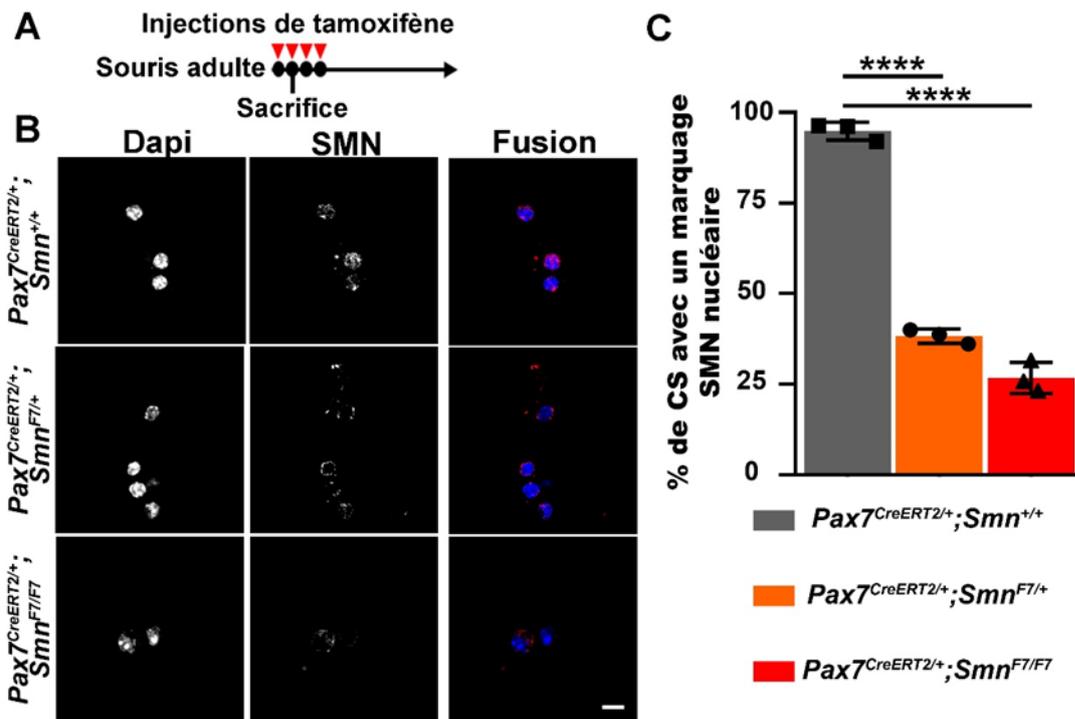


**Figure 12 : Le comportement des CS est perturbé au cours de la myogenèse post-natale des souris SMA très sévère. (A et D)** Images représentatives de coupes transversales de TA de souris SMA et CTR 4 jours après la naissance, immunomarquées pour Pax7 (rouge), MyoD (vert) et la laminine (orange) (A) ou MyoD (rouge), MyoG (vert) et la laminine (orange) (D). Les noyaux sont marqués avec le DAPI. (B-C) Histogrammes représentant le nombre de cellules Pax7+MyoD- (B) et Pax7+MyoD+ (C) normalisé pour 100 fibres et quantifié comme montré en (A). (E) Histogramme représentant le nombre de cellules MyoD+MyoG+ quantifié comme montré en (D). Les valeurs indiquées représentent la moyenne +/-s.e.m de quantifications réalisées sur les 2 muscles TA de 3 souris par groupe. Un minimum de 400 fibres/TA a été quantifié (Test de normalité de Shapiro-Wilk, Test de Student non apparié, avec \* $p < 0.05$  et \*\* $p < 0.01$ ). Les flèches indiquent les cellules doublement marquées.

#### 4.1.3. Génération d'un nouveau modèle murin KO conditionnel inducible

##### *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*

Pour pouvoir étudier le rôle de SMN uniquement dans les CS et s'affranchir de tout impact de la perte de SMN dans le système nerveux central sur le muscle, nous avons généré un modèle murin KO conditionnel inducible, permettant l'ablation ciblée de l'allèle *Smn* floxé dans les CS Pax7+. Pour cela, nous avons croisé la lignée murine exprimant la recombinase CreERT2 sous le contrôle du promoteur de Pax7 développée par le laboratoire de C.Fan avec les souris dont l'exon7 du gène endogène *Smn* est entouré de séquences de recombinaison F7 développées par le laboratoire de J.Melki (Frugier et al., 2000; Lepper et al., 2009). Ce modèle permet d'induire la recombinaison des séquences F7 par la Cre recombinase spécifiquement dans les CS Pax7+ grâce à une série d'injections de tamoxifène. Le génotype de la première génération obtenue est : *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>*. Ces souris sont ensuite croisées



**Figure 13** : Perte de la localisation nucléaire de SMN dans les CS des muscles  $Pax7^{CreERT2/+}; Smn^{F7/+}$  et  $Pax7^{CreERT2/+}; Smn^{F7/F7}$ , après 2 injections de tamoxifène. (A) Chronographe de l'expérience. (B) Photos représentatives de CS purifiées par cytométrie en flux puis immunomarquées pour SMN. Les noyaux sont colorés par le DAPI. (C) Histogramme montrant le pourcentage de noyaux SMN positifs par rapport au nombre total de noyaux. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois quantifications indépendantes +/- s.e.m (Test ANOVA à un facteur,  $p < 0.0001$ ; test post hoc de comparaisons multiples de Dunnett, CTR vs HTZ \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; CTR vs HMZ \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.

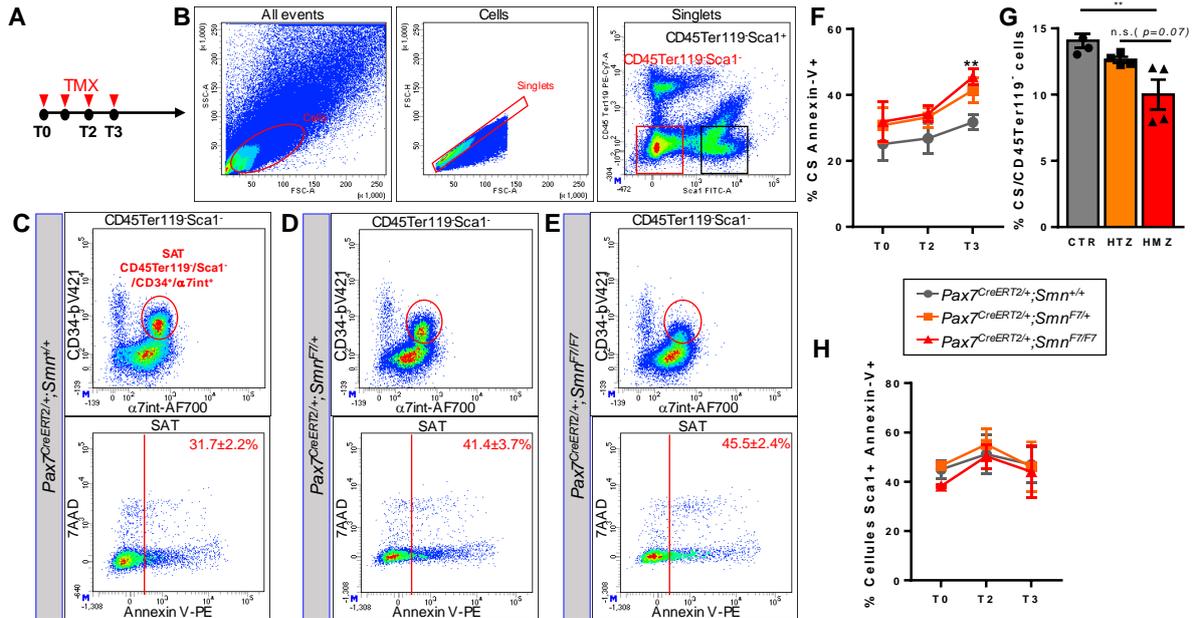
pour obtenir les 3 génotypes suivants :  $Pax7^{CreERT2/+}; Smn^{+/+}$  (contrôle, CTR),  $Pax7^{CreERT2/+}; Smn^{F7/+}$  (hétérozygote, HTZ) et  $Pax7^{CreERT2/+}; Smn^{F7/F7}$  (homozygote, HMZ).

Les anticorps anti-SMN actuellement disponibles fonctionnant mal sur sections musculaires, nous avons analysé l'expression de SMN par immunofluorescence sur des CS purifiées afin d'évaluer l'efficacité de la recombinaison induite par notre protocole d'injection du tamoxifène. Comme le temps de demi-vie de la protéine SMN est de l'ordre de 4h nous avons sacrifié les souris après la seconde injection afin d'être chronologiquement juste après la perte de la protéine (Fig 13A, Burnett et al., 2009). Brièvement, les muscles de souris adultes  $Pax7^{CreERT2/+}; Smn^{+/+}$ ,  $Pax7^{CreERT2/+}; Smn^{F7/+}$  et  $Pax7^{CreERT2/+}; Smn^{F7/F7}$  ont été digérés, puis les CS purifiées par cytométrie en flux à l'aide des marqueurs de surface comme précédemment décrit (i.e. CD34, Sca1 et  $\alpha$ 7-intégrine) (Didier et al., 2012). Les CS triées ont ensuite été fixées et immunomarquées pour SMN (Fig 13B).

Dans notre modèle murin, l'exon7 entouré par les séquences de recombinaison F7, contient la séquence codant pour la localisation nucléaire de SMN (Frugier et al., 2000; Le et al., 2000; Zhang et al., 2007). Les CS recombinées sont donc distinguables des autres cellules par la perte du marquage en forme de points caractéristique de SMN dans le noyau comme

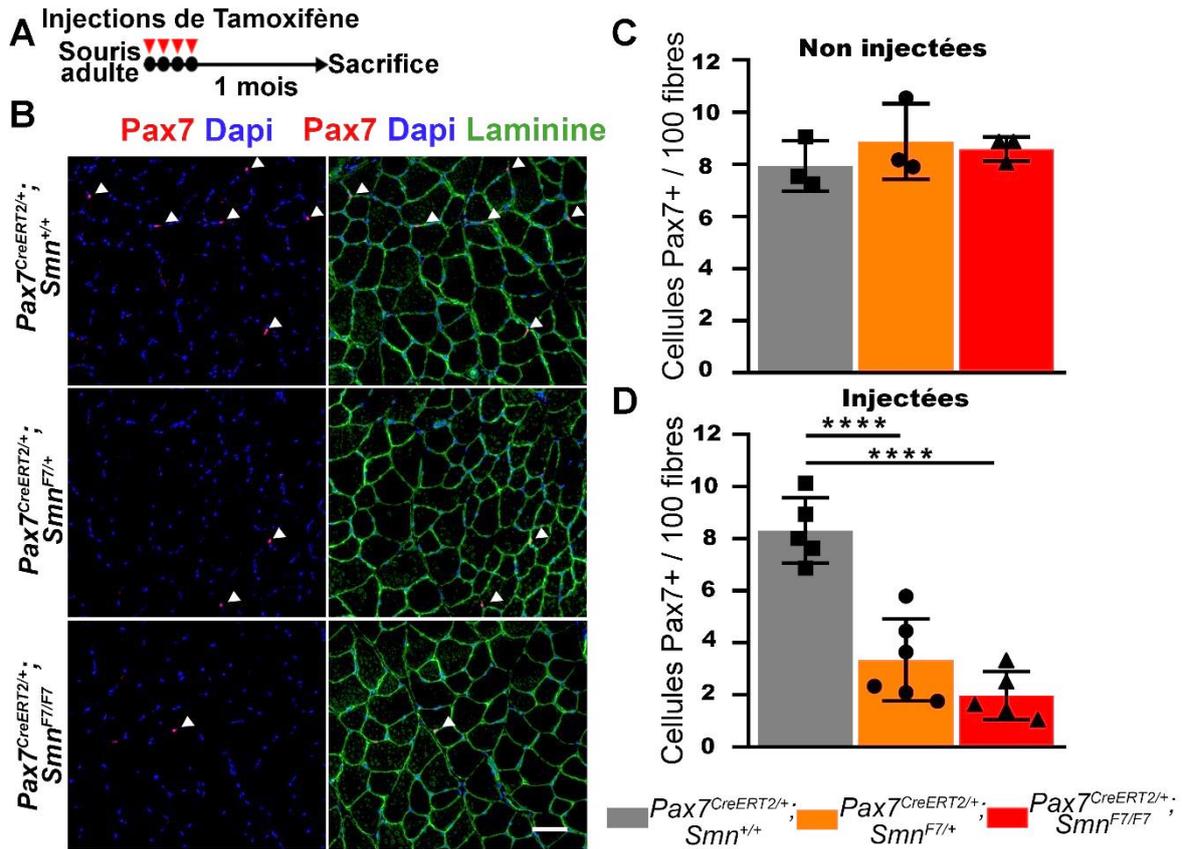
observé dans les CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>* (Fig 13B, panel *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*). Nos résultats montrent que la quasi-totalité des CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>* présentent un marquage nucléaire de SMN contre respectivement 38% et 27% pour les CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* (Fig 13C). Ainsi, après seulement 2 injections de tamoxifène, la recombinaison de l'exon 7 du gène *Smn* s'est déjà déroulée dans 60% des CS des muscles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et 70% des CS des muscles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*.

#### 4.1.4. Le déficit en SMN induit la mort par apoptose des CS quiescentes, conduisant à une perte du pool de CS dans les muscles adultes



**Figure 14 : La perte d'un ou des 2 allèles de *Smn* conduit à une mort rapide par apoptose des CS quiescentes du muscle adulte. (A)** Chronogramme de l'expérience. **(B-E)** Profils de FACS représentatifs montrant la stratégie d'analyse de l'apoptose des CS (CD45-Ter119/Sca1<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/α7-int<sup>+</sup>) purifiées à partir de muscles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* après 4 injections de tamoxifène (T3). **(F-G)** Graphiques montrant la proportion de CS **(F)** et cellules Sca1<sup>+</sup> **(H)** apoptotiques (% total de cellules Annexin-V<sup>+</sup>) déterminée comme montré en **(B-E)**. **(G)** Histogramme montrant la proportion de CS dans la population CD45Ter119<sup>-</sup> au temps T3. Les valeurs représentent la moyenne ± s.e.m. de 3 souris par génotype (Test ANOVA à deux facteurs, test post hoc de comparaisons multiples de Tukey avec \*\**p*<0.01).

Comme décrit en introduction, plusieurs études ont montré que le SMN est impliquée dans la survie de différents types cellulaires. De plus, des CS apoptotiques ont été observées en microscopie électronique sur des muscles de souris SMA, suggérant qu'un déficit en SMN pourrait affecter la survie des CS musculaires (Dachs et al., 2011). Grâce à notre modèle de souris KO conditionnel, nous avons dans un premier temps cherché à savoir si un déficit en SMN pouvait affecter la survie des CS quiescentes dans le muscle adulte. Compte tenu de la demi-vie courte de SMN et de l'efficacité de recombinaison, nous avons quantifié la proportion de CS en apoptose à des temps très précoces, c'est à dire dès la première injection de tamoxifène, par cytométrie en flux. Brièvement, les cellules mononuclées provenant de



**Figure 15 :** L'ablation partielle ou complète de *Smn* conduit à la déplétion du pool de CS quiescentes dans les muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*. (A) Chronographe de l'expérience (B) Images représentatives de sections de TA immunomarquées pour Pax7 (rouge) et la laminine (vert). Les noyaux sont colorés par le DAPI. (C-D) Histogrammes présentant le nombre de cellules Pax7+/100 fibres pour les souris non injectées par le tamoxifène (C) et injectées (D) quantifié à partir de sections comme montré en (A). Les valeurs indiquées sont la moyenne+/-s.e.m d'au moins 5 souris/groupe (Test ANOVA à un facteur, \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; test post hoc de comparaisons multiples de Dunnett, CTR vs HTZ \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; CTR vs HMZ \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Les flèches indiquent les cellules satellites Pax7+. Barre d'échelle 100  $\mu$ m.

muscles digérés de souris adultes *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*, ont été immunomarquées par des anticorps couplés permettant d'identifier les CS comme précédemment indiqué, puis marquées avec de l'Annexine-V couplée à un fluorophore pour détecter les cellules apoptotiques (Fig 14A).

Nos analyses montrent une augmentation de la proportion de CS apoptotiques (Annexin-V<sup>+</sup>) dans les muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* par rapport aux muscles contrôles au temps T3, c'est-à-dire le jour de la 4<sup>ème</sup> injection de tamoxifène. Cette augmentation est plus marquée pour les muscles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* (31.7±2.2 vs 45.5±2.1, CTR vs HMZ, \*\* $p < 0.01$ ) suggérant que le déficit en SMN induit l'apoptose des CS de façon dose-dépendante (Fig 14B-F). En accord avec ces résultats, la proportion de CS (CD45Ter119<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> $\alpha$ 7<sup>+</sup>) est diminuée dans les muscles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* par rapport aux muscles contrôles (Fig 14C-E et H). Enfin, pour confirmer que cette augmentation de l'apoptose est due à l'ablation de *Smn* induite par l'activité de la Cre

recombinase dans les CS, nous avons également quantifié la proportion de cellules Sca1+ en apoptose. Comme attendu, nous n'avons observé aucune différence entre les différents génotypes confirmant la spécificité de notre système (Fig 14G).

Ces expériences révèlent que des niveaux élevés de SMN sont nécessaires à la survie des CS quiescentes dans le muscle adulte. Afin d'évaluer l'effet du déficit en SMN à plus long terme, nous avons quantifié le nombre de cellules Pax7+ sur des sections de muscles TA, un mois après les injections de tamoxifène (Fig 15A-B). Comme attendu, en l'absence d'injections de tamoxifène, le nombre de CS Pax7+ est en moyenne de 8 cellules Pax7+/100 fibres quelque soit le génotype des souris (Fig 15C). Lorsque la recombinaison du gène *Smn* est induite par les injections de tamoxifène, nous constatons une diminution significative du nombre de CS dans les souris homozygotes *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* et également de façon légèrement moins marquée dans les souris hétérozygotes *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* par rapport aux souris contrôles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>* (Fig 15B-D, CTR : 8.3 Pax7+/100 fibres; HTZ : 3.3 Pax7+ /100 fibres et HMZ : 1.3 Pax7+/100 fibres). Enfin d'après ces résultats, nous pouvons supposer qu'après les 4 injections de tamoxifène l'efficacité de recombinaison est très probablement supérieure, de l'ordre de 85%.

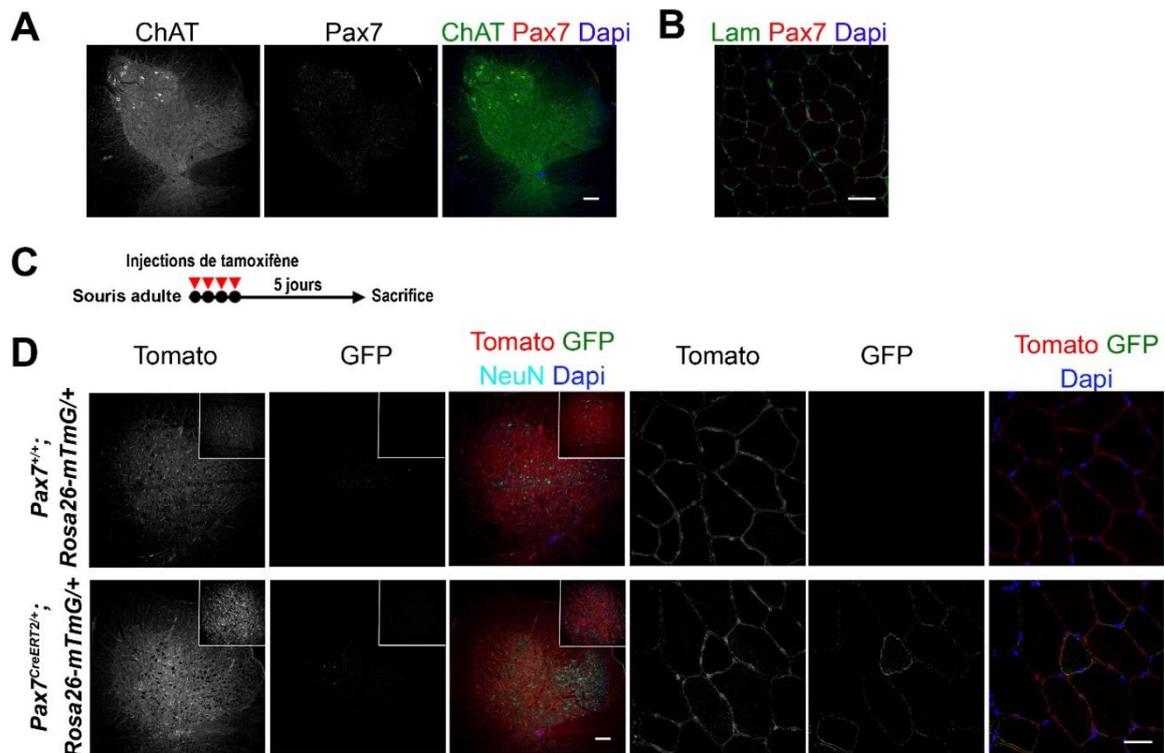
Nous avons montré que l'absence complète, mais aussi la demi-dose de SMN, induisent la mort des CS par apoptose ce qui conduit, à plus long terme, à une déplétion du pool de CS quiescentes. Avec ces expériences, nous avons donc identifié un nouveau rôle muscle-spécifique de SMN dans le maintien du pool de CS quiescentes dans le muscle adulte. Au total, les résultats de cette première partie suggèrent que la diminution du nombre de CS Pax7+ observée sur les biopsies de patients SMA pourrait résulter d'une altération de la capacité des CS à entrer en quiescence pour constituer le pool de CS au cours de la myogenèse post-natale, mais également d'une perte des CS quiescentes par apoptose due au déficit en SMN.

#### **4.2. Etude du rôle des CS musculaires dans la physiopathologie de la SMA**

La SMA est caractérisée par la dégénérescence sélective des motoneurons de la corne ventrale de la moelle épinière. Fait intéressant, des études récentes utilisant un modèle murin de déplétion des CS musculaires suggèrent que ces cellules auraient un rôle important dans la régénération et le maintien des JNM lors de lésions neuromusculaires et du vieillissement, notamment en régulant l'intégrité du compartiment post-synaptique (Liu et al., 2017).

De plus, nos données démontrent que la diminution du niveau de SMN conduit à une perte significative du nombre de CS musculaires dans le muscle adulte. Le deuxième objectif de ce travail de thèse a donc consisté à déterminer si cette déplétion en CS pouvait affecter à elle seule l'intégrité des MN et ainsi contribuer à la pathogenèse de la SMA.

#### 4.2.1. Evaluation de la spécificité de la recombinaison par la Cre recombinase ERT2 sous le contrôle du promoteur Pax7



**Figure 16 : Aucun évènement de recombinaison n'est observé dans la moelle épinière du modèle murin rapporteur  $Pax7^{CreERT2/+}; Rosa26-mTmG$ . (A-B)** Images représentatives de sections de moelle épinière (A) et de muscle TA (B, contrôle positif) de souris non injectées  $Pax7^{CreERT2/+}; Smn^{+/+}$ , immunomarquées pour Pax7 (rouge) et ChAT (vert) (A) ou Pax7 et la laminine (B). Les noyaux sont colorés par le DAPI. **(C)** Chronogramme des injections. **(B-C)** Images représentatives de sections de moelles épinières (B) et de muscles (C). Les sections de moelles ont été immunomarquées pour la GFP (vert) et la NeuN (Cyan). Les noyaux sont marqués par le DAPI. 3 souris par génotype ont été analysées. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

Pax7 étant exprimé au cours développement dans la moelle épinière (Gard et al., 2017), nous avons réalisé des immunomarquages sur des moelles de souris contrôles (souris non injectées  $Pax7^{CreERT2/+}; Smn^{+/+}$ , Fig 16A) pour s'assurer de l'absence d'expression de Pax7 à l'âge adulte en particulier dans les MN. Pour ces analyses, nous avons utilisé des sections de muscles immunomarquées selon le protocole d'immunomarquage de la moelle épinière comme contrôle positif (Fig 16B). Comme anticipé, nous n'observons aucune expression de Pax7 dans les moelles de souris adultes quelque soit le niveau de la moelle analysé (Fig 16A).

Afin de confirmer la recombinaison induite par l'activation de la Cre recombinase ERT2 sous le contrôle du promoteur Pax7 dans les CS musculaires et non dans les cellules neuronales à proximité des MN ou les MN eux-mêmes, nous avons généré un modèle murin rapporteur  $Pax7^{CreERT2/+}; Rosa26-mTmG$  (Muzumdar et al., 2007). Les cellules de ces souris expriment constitutivement une protéine fluorescente Tomato membranaire. L'activation de la Cre recombinase par les injections de tamoxifène entraîne la recombinaison du transgène mTmG

permettant l'expression de la GFP également membranaire. Pour ces expériences les souris adultes *Pax7<sup>+/+</sup>;Rosa26-mTmG* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Rosa26-mTmG* ont été injectées pendant 4 jours consécutifs et sacrifiées 5 jours plus tard (Fig 16A). Nous avons ensuite recherché la présence de potentiels évènements de recombinaison sur des sections de moelles épinières cervicales, thoraciques et lombaires immunomarquées pour la GFP et la protéine NeuN (Neuronal Nuclei) exprimée, entre autre, par les MN. Nos analyses n'ont révélé aucun signal GFP imputable à une recombinaison par la CreERT2 dans les cellules neuronales NeuN+ (Fig 16B). En revanche, comme attendu, sur des sections de muscles de souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Rosa26-mTmG*, l'expression du transgène GFP est facilement observable même sans réaliser d'immunomarquage (Fig 16C). Ces expériences confirment la spécificité de notre modèle murin et valident la pertinence de l'utilisation de ce modèle pour l'étude du rôle des CS dans la physiopathologie de la SMA.

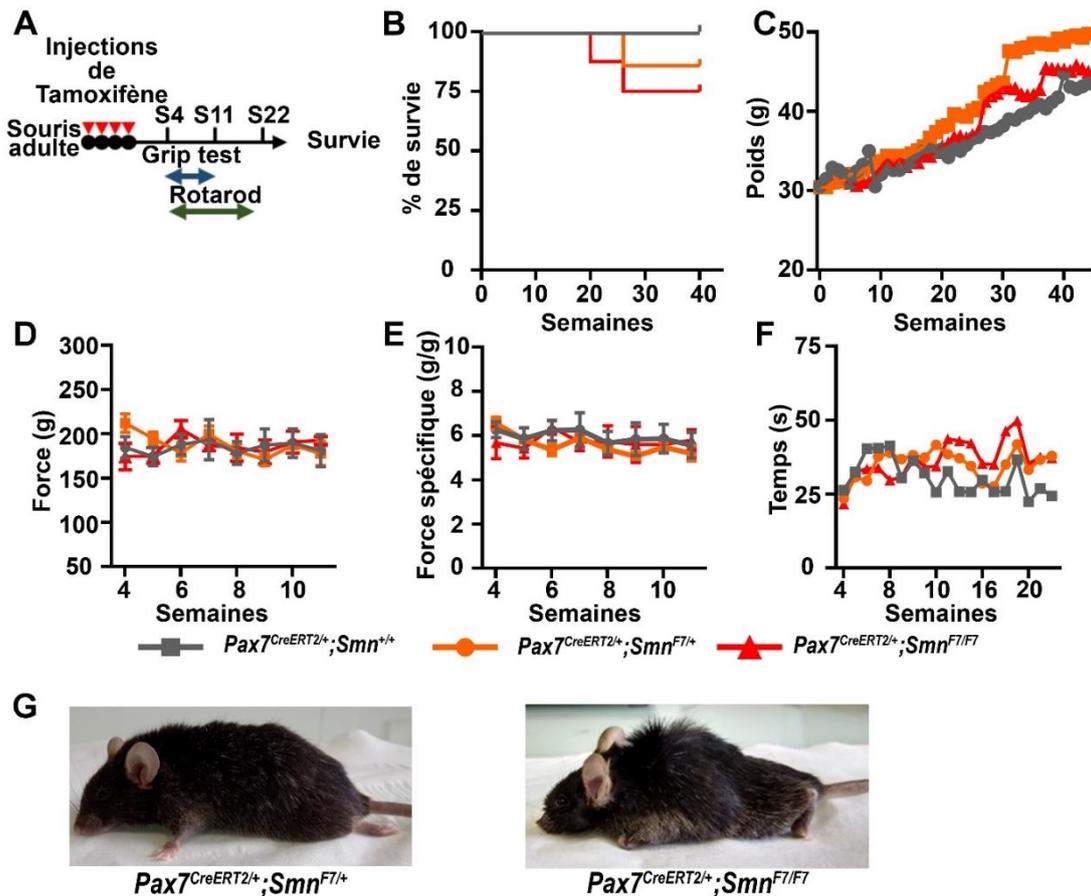
#### **4.2.2. La déplétion des CS induite par le déficit en SMN n'affecte pas significativement la survie ni les capacités motrices des souris adultes sédentaires**

Afin d'étudier le rôle des cellules CS musculaires dans le développement de la SMA, nous avons tout d'abord comparé le phénotype général des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* après les injections de tamoxifène. Pour cela nous avons analysé la survie, et suivi l'évolution du poids et des capacités motrices des souris. A partir de la 4<sup>ème</sup> semaine après les injections de tamoxifène, nous avons réalisé hebdomadairement une série de tests permettant la mesure de la force de préhension des 4 membres (Grip test) et de la coordination motrice (Rotarod) pendant respectivement 8 et 12 semaines (Fig 17A).

Aucune différence statistiquement significative n'a été constatée en termes de survie et de poids (Fig 17B-C). De même, nous n'avons détecté aucune différence de force et force spécifique des quatre membres et de coordination motrice entre les 3 génotypes (Fig 17C-D-E-F). Ainsi, en conditions homéostatiques, la déplétion du pool de CS induite par le déficit en SMN ne semble pas affecter pas de manière significative le phénotype général de souris sédentaires. Cependant, il est important de noter qu'une petite proportion de souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* (1/8) et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* (2/8) ont spontanément présenté des signes de paralysie des membres inférieurs, et d'atrophie musculaire associée à une cyphose sévère (Fig 17B-G), 26 et 20 semaines respectivement après les injections de tamoxifène. La déplétion des CS musculaires induite par le déficit en SMN affecte, à long terme, l'intégrité des MN- $\alpha$  conduisant à des changements phénotypiques des fibres musculaires

##### **4.2.2.1. Diminution du nombre de MN dans les moelles épinières des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>***

Comme certaines souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* ont néanmoins présenté un phénotype sévère, nous avons décidé de sacrifier les souris 6 mois après les

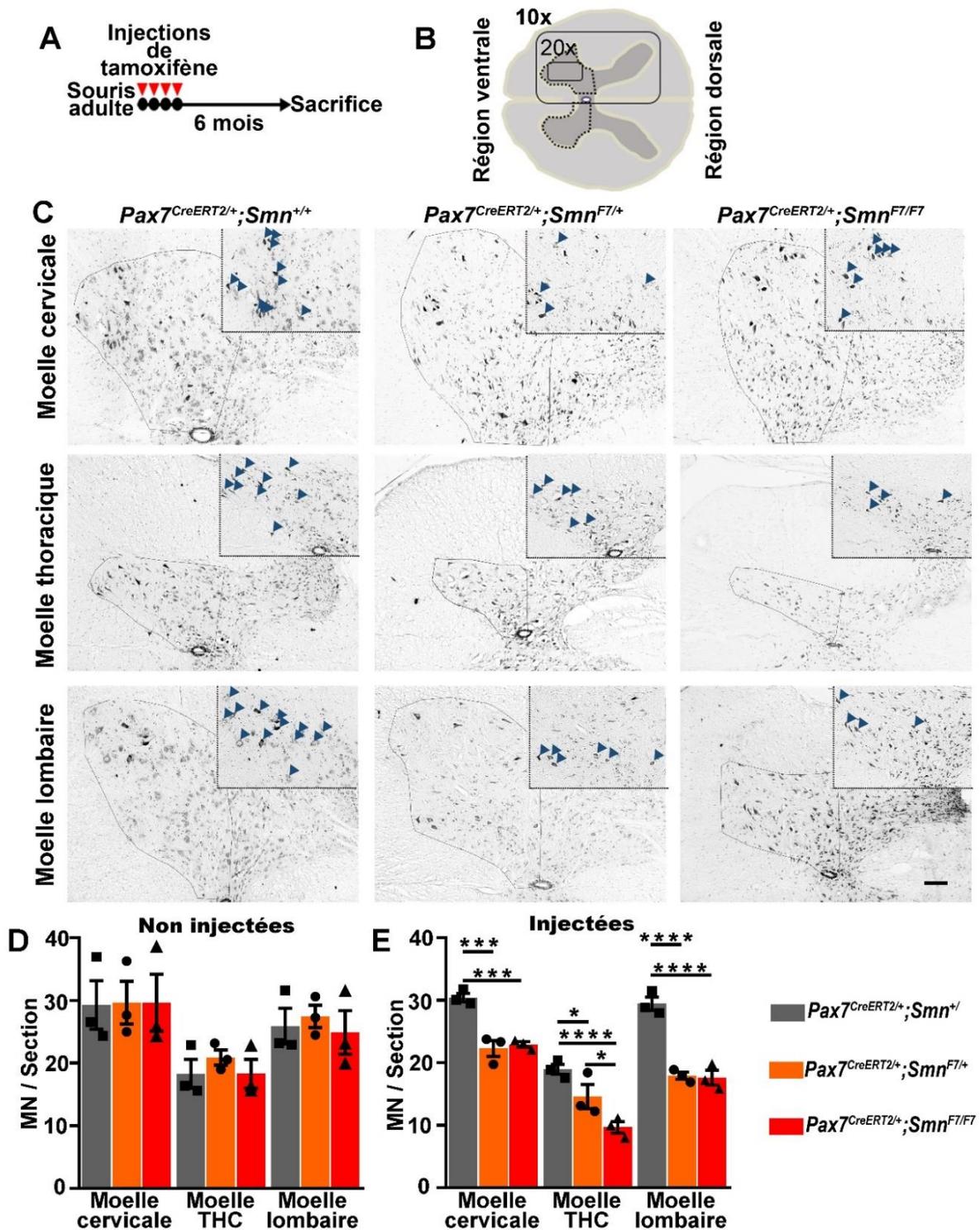


**Figure 17 : La perte des CS n'affecte pas significativement la survie ni les capacités motrices des souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/+}$  et  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  en conditions homéostatiques. (A)** Chronographe de l'expérience. **(B)** Courbe de survie de Kaplan-meier. **(C)** Courbe de poids durant les 40 semaines (S) suivant les injections de tamoxifène. **(D)** Courbe de la force moyenne des 4 membres calculée en grammes (g) sur une durée de 8 semaines. **(E)** Force spécifique calculée à partir de la force mesurée (g) / par le poids (g). **(F)** Courbe du temps moyen passé sur l'appareil (rotarod) avant la chute en secondes (s). **(G)** Photos des souris ayant présenté une paralysie des membres inférieurs (à gauche) et une cyphose (à droite). Les valeurs indiquées sont les moyennes +/- s.e.m des valeurs obtenues pour 8 souris/génotype.

injections de tamoxifène pour réaliser une analyse plus poussée du système neuromusculaire (Fig 18A). Nous avons tout d'abord quantifié le nombre de MN sur des sections transversales de moelles épinières (au niveau cervical, thoracique et lombaire) colorées selon la méthode de Niels pour identifier les MN d'après leur taille et leur localisation dans les cornes ventrales de la moelle épinière (Fig 18BC)

Comme anticipé, le nombre de MN/section ne diffère pas entre les différents génotypes de souris non injectées quel que soit le niveau de la moelle analysé (Fig 18D). Cependant, 6 mois après les injections de tamoxifène, nous avons constaté une diminution statistiquement significative du nombre de MN chez les souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/+}$  et  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  par rapport aux souris contrôles, à tous les niveaux des moelles analysés : cervical, thoracique et lombaire (Fig 18C-E). En effet, nous observons une réduction de 30% du nombre de MN dans les régions cervicales et lombaires des moelles des souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/+}$  et

*Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* par rapport aux contrôles. Au niveau thoracique, cette diminution est de 25% pour les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et de 50% pour les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* par rapport aux souris contrôles. De plus, nous notons une différence statistiquement significative entre le nombre de MN des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*. Ainsi, nous supposons que les phénotypes sévères observés chez certaines de nos souris pourraient résulter au moins partiellement de cette perte de MN, particulièrement marquée au niveau de la moelle thoracique dont les MN innervent entre autres les muscles du dos.

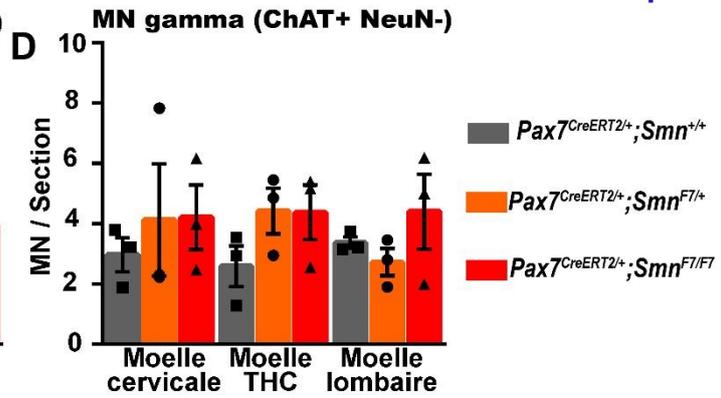
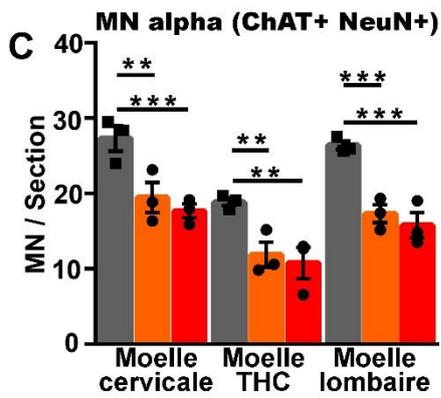
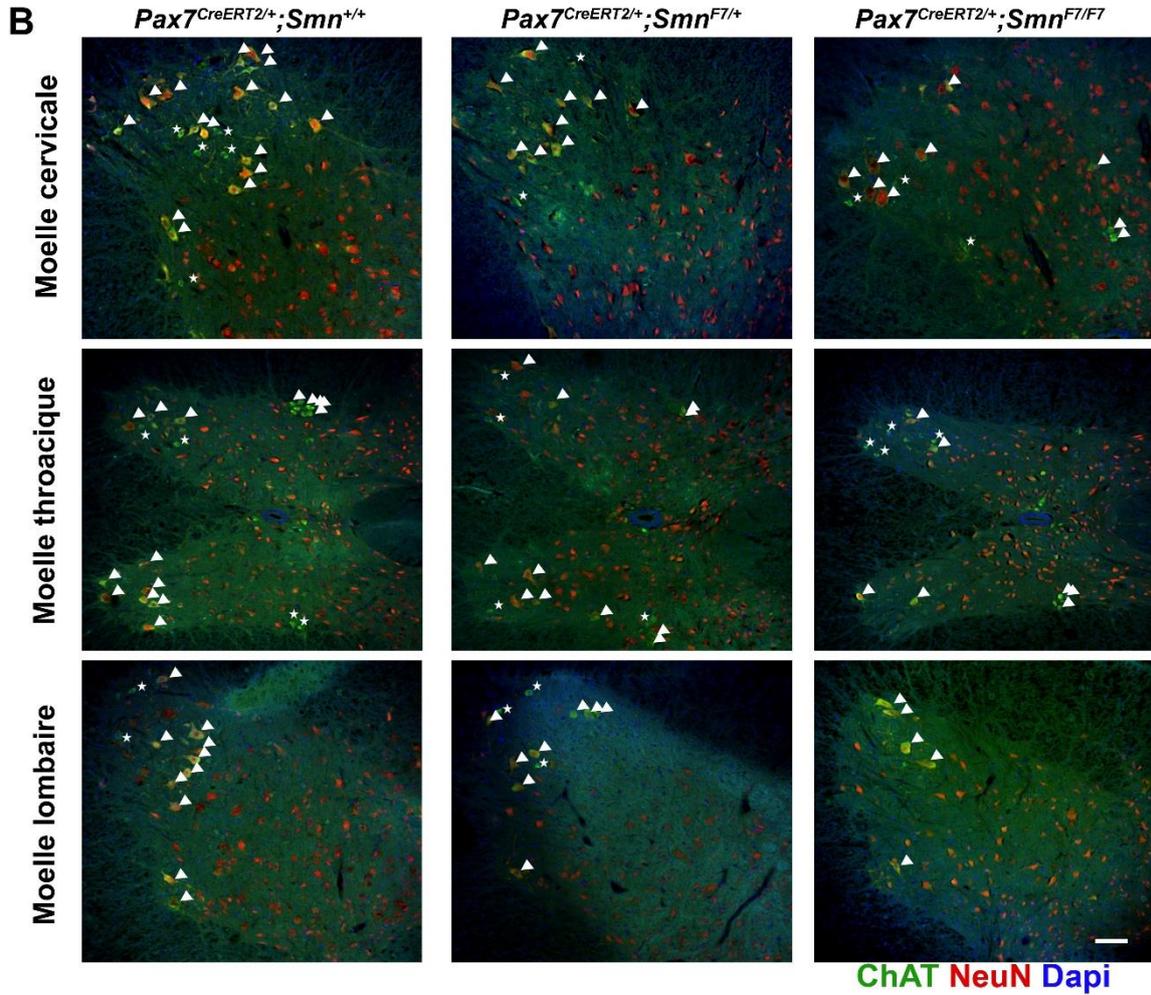
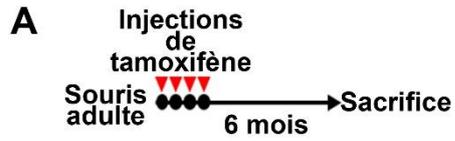


**Figure 18** : Le nombre de MN est significativement réduit dans les moelles épinières des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/F7</sup>* 6 mois post-TMX. (A) Chronographe de l'expérience. (B) Schéma d'une section transversale de moelle. Les lignes continues représentent le champ des photos aux grossissements 10x et 20x, et les lignes pointillées les zones de comptage des MN. (C) Photos représentatives des sections de moelles épinières des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/F7</sup>* colorées par la technique de Niels, 6 mois post-tamoxifène. (D-E) Histogrammes montrant le nombre de MN par section comptés d'après leur taille et leur localisation comme montré en (C), des souris non injectées (D) et injectées (E). Les valeurs sont la moyenne +/- s.e.m de trois quantifications indépendantes (3 souris/génotype, Test ANOVA à deux facteurs,  $p < 0,001$ ; test post hoc de comparaisons multiples de Dunnett,  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0.001$   $****p < 0.0001$ ). THC : thoracique, les flèches indiquent les motoneurones. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.*****

#### 4.2.2.2. Perte sélective des MN- $\alpha$ dans les moelles épinières des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/F7</sup>***

Les premières études ayant mis en évidence une perte des motoneurones chez les patients SMA étaient basées uniquement sur des critères de taille du corps cellulaire des MN et de localisation (Robertson et al., 1978). Depuis, plusieurs marqueurs permettant de distinguer les différents types de MN ont été décrits dont la ChAT (Choline AcetylTransferase) et NeuN (Neuronal Nuclei). Ainsi, les motoneurones alpha (MN- $\alpha$ ) innervant les fibres musculaires expriment les 2 marqueurs (ChAT+NeuN+) alors que les motoneurones gamma (MN- $\gamma$ ) innervant les fibres musculaires intrafusales n'expriment pas la protéine NeuN (ChAT+NeuN-) (Friese et al., 2009). Fait intéressant, grâce à ces marqueurs, une étude récente a démontré que seule la population de MN- $\alpha$  est affectée dans la moelle épinière de souris SMA sévères, alors que les MN- $\gamma$  ne sont pas touchés (Powis and Gillingwater, 2016). Par conséquent, afin de quantifier les MN- $\alpha$  et les MN- $\gamma$ , nous avons réalisé un immunomarquage pour la ChAT et NeuN sur des sections de moelles épinières des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/F7</sup>*, 6 mois post-tamoxifène, (Fig 19A-B). De façon similaire à la Fig 18, le nombre de MN- $\alpha$  ChAT+NeuN+ est significativement diminué de l'ordre de 30% dans la moelle cervicale et lombaire et de 50% dans la moelle thoracique pour les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/F7</sup>* (Fig 19C). A l'inverse, le nombre de MN- $\gamma$  ChAT+NeuN- ne varie pas entre les différents niveaux de moelle et entre les génotypes (Fig 19D).*****

Au total, ces analyses démontrent que l'ablation, même partielle, de *Smn* ciblée dans les CS musculaires est suffisante pour induire une perte des MN. De plus, cette perte cible sélectivement les MN- $\alpha$  sans affecter les MN- $\gamma$ , comme cela a été décrit dans les souris SMA sévère (Powis and Gillingwater, 2016). Ces résultats montrent pour la première fois, que le déficit en SMN induit la déplétion du pool de CS musculaires dans un muscle adulte qui peut à long terme affecter l'intégrité des MN- $\alpha$  et apportent des éléments de preuve d'une possible participation des CS musculaires dans la physiopathologie de la SMA.



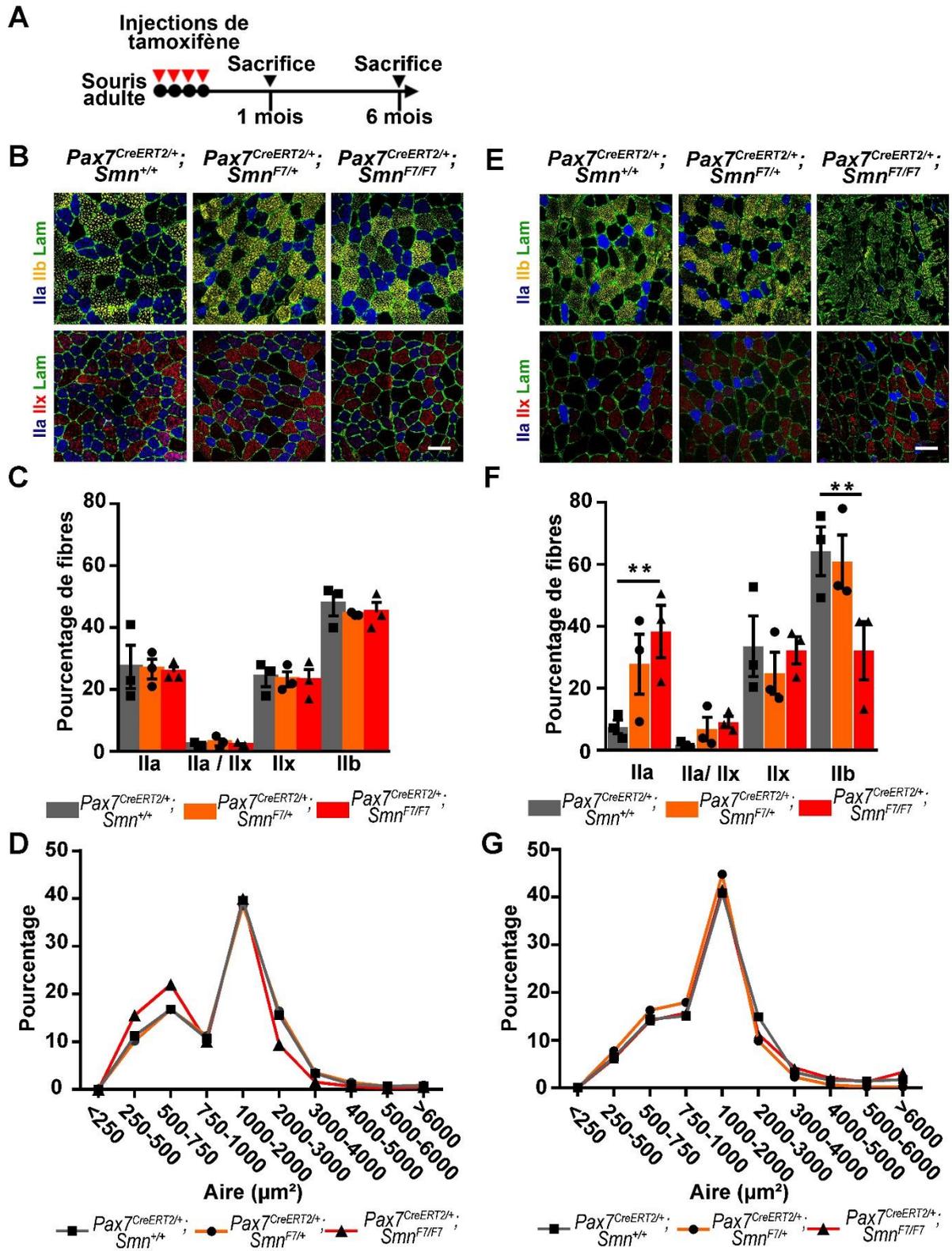
**Figure 19 : La déplétion des CS musculaires induite par le déficit en SMN affecte sélectivement les MN $\alpha$  en épargnant les MN $\gamma$ .** (A) Chronographe de l'expérience (B) Sections représentatives de moelles épinières de souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* immunomarquées pour la ChAT (vert) et NeuN (rouge). Les noyaux sont marqués avec le DAPI. (C-D) Histogrammes montrant la quantification des MN- $\alpha$  (C) et des MN $\gamma$  (D) par section comme montré en (B). Les valeurs sont la moyenne +/- s.e.m de trois quantifications indépendantes (3 souris/génotype, test ANOVA à deux facteurs,  $p < 0.001$  ; test post hoc de comparaisons multiples de Dunnett,  $**p < 0.01$   $***p < 0.001$ ). THC : thoracique, les flèches indiquent les MN- $\alpha$ , les étoiles les MN $\gamma$ . Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

#### 4.2.3. Changements phénotypiques des fibres musculaires dans les muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*

Nos résultats montrant une réduction du nombre de MN dans la moelle épinière des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*, nous avons par la suite analysé le phénotype des fibres musculaires étroitement lié à l'innervation. Pour cela nous avons réalisé une caractérisation des différents types de myosines retrouvées dans le TA à 1 et 6 mois après les injections de tamoxifène dans les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*, par immunofluorescence (Fig 20A).

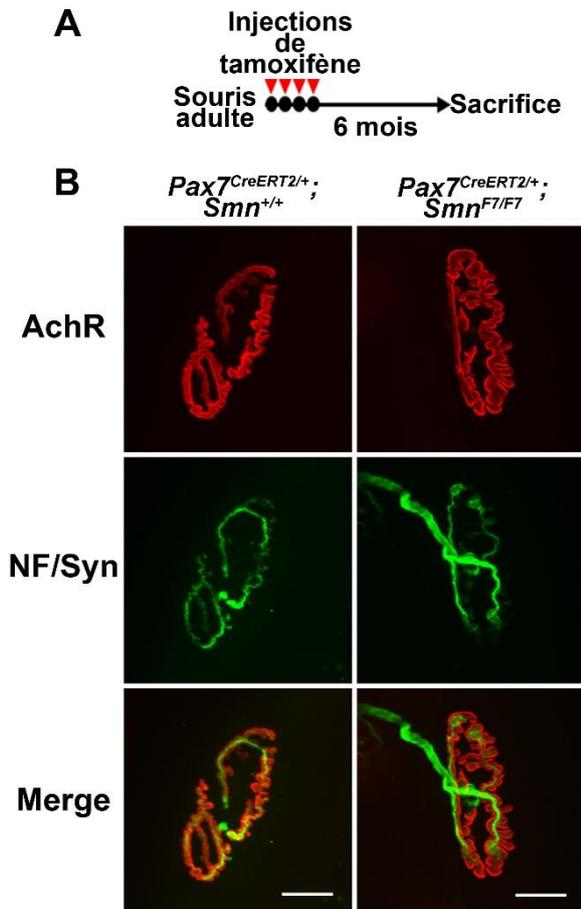
Un mois post-TMX, nous n'observons pas de différence significative dans la distribution des différents types de fibres musculaires et des aires des fibres entre les génotypes (Fig 20B-C-D).

A l'inverse, 6 mois post-TMX, en accord avec la diminution du nombre de MN observée, les TA des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* présentent les caractéristiques typiques d'un phénomène de dénervation/ré-innervation des muscles rapides à savoir, une augmentation significative de la proportion de fibres IIa et une diminution significative des fibres IIb comparée aux souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>* (fibres de type IIa :  $7.6 \pm 2.2\%$  vs  $38.3 \pm 8.4\%$  – fibres de type IIb :  $64.3 \pm 7.8\%$  vs  $32.2 \pm 9.4\%$ , CTR vs HMZ,  $**p < 0.01$ , Fig 20E-F). De plus, les muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* montrent une augmentation des fibres de transitions IIa/IIx signe d'un changement de l'expression des chaînes lourdes de myosine dans la fibre musculaire dû à une ré-innervation par un MN adjacent. Il est également intéressant de noter que les muscles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* présentent un phénotype intermédiaire pouvant être relié à la diminution plus faible du nombre de CS dans ces souris (Fig 20E-F). Enfin, de façon identique à ce que nous observons un mois après injection du tamoxifène, nous ne constatons pas de différences dans la répartition des aires des fibres comme cela a été démontré dans d'autres modèles de déplétion des CS musculaires (Egner et al., 2016; Fry et al., 2014a, 2015, 2017; Keefe et al., 2015; Murach et al., 2017) (Fig 20G).



**Figure 20 : L'ablation de *Smn* dans les CS conduit à des changements phénotypiques des fibres musculaires à long terme. (A)** Chronographe de l'expérience **(B et E)** Sections représentatives de TA des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* immunomarquées pour les chaînes lourdes des myosines de type IIa (bleu), IIx (rouge), IIb (jaune) et la laminine (vert). **(C et F)** Histogrammes montrant la répartition des types de fibres dans le TA 1 mois **(C)** et 6 mois post tamoxifène **(F)**. **(D et G)** Répartition des aires de fibres en  $\mu\text{m}^2$  mesurées par la macro MuscleJ fonctionnant avec le logiciel ImageJ. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  s.e.m de trois quantifications indépendantes (3 souris/génotype, test ANOVA à deux facteurs,  $p < 0.0001$ ; test post hoc de comparaisons multiples de Dunnett,  $**p < 0.01$ ). Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.4. Aucun défaut morphologique des JNM n'est observable dans les muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* 6 mois post-TMX



**Figure 21 : Aucun défaut morphologique des JNM n'est observable dans les muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* 6 mois post-TMX. (A)** Chronographe de l'expérience **(B)** Images représentatives des JNM des muscles de souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>+/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* marquées pour les AchR (rouge), la synaptophysine (vert) et les neurofilaments (vert). Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

Nos données indiquant une perte des MN- $\alpha$  couplée à une transition des types de fibres caractéristique d'un phénomène de dénervation/ré-innervation, nous avons par la suite réalisé une analyse morphologique des JNM, 6 mois post-TMX. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Laure Stochlic et Bertrand Fontaine (U974 – Centre de Recherche en Myologie).

Pour étudier la structure des synapses, des fibres isolées du TA ont été marquées par l' $\alpha$ -bungarotoxine pour identifier les AchR et avec un mix d'anticorps dirigés contre les neurofilaments (NF) et la synaptophysine (Syn) pour respectivement marquer les axones et la partie terminale des nerfs, 6 mois après l'injection de tamoxifène (Fig 21A). Comme illustré par la fig 21, les JNM des muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* ne montrent aucun défaut

morphologique comparées à celles des muscles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, avec la partie post synaptique formant un réseau continu avec la structure en forme de bretzel caractéristique et un axone présent sur toutes jonctions observées (21 B).

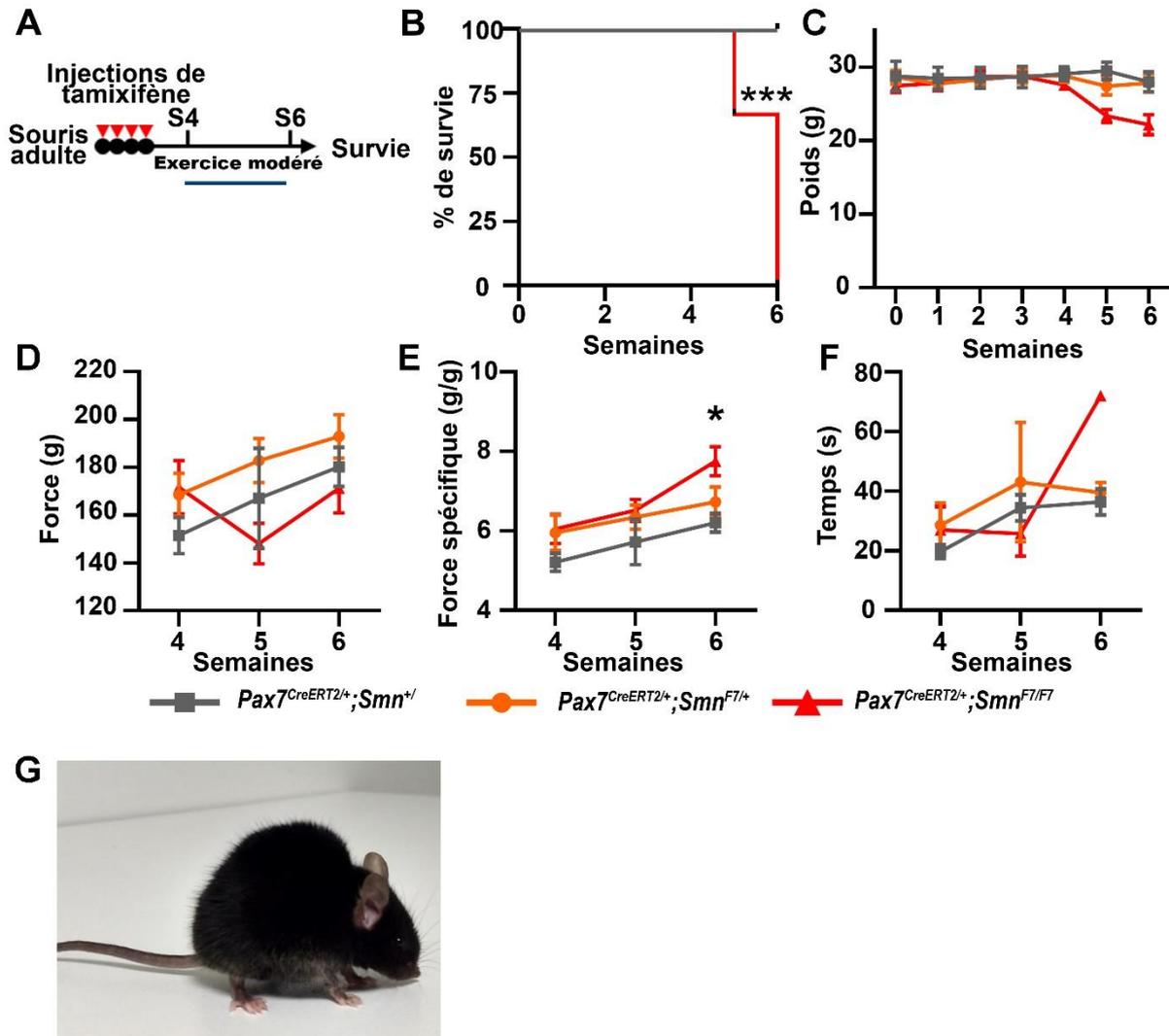
Ces données indiquent donc que 6 mois post-TMX, les JNM présentes dans les muscles de souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* ne semblent pas être affectées par la déplétion en CS. Ces observations ne nous permettent pas établir un lien direct entre la perte des CS et la perte des MN observée 6 mois plus tard. Cependant, compte tenu des données de la littérature (Liu et al., 2017), nous supposons qu'une atteinte des JNM précède la perte des MN dans notre modèle. Notre hypothèse est que nos analyses des JNM ont probablement été faites trop tardivement, ou que l'atteinte des JNM se fait de manière progressive rendant sa mise en évidence difficile.

L'ensemble des résultats obtenus grâce à notre modèle murin de KO conditionnel inductible, montrent qu'un déficit en SMN induit la mort des CS musculaires de façon dose-dépendante. Cette déplétion en CS musculaires, affecte sélectivement l'intégrité des MN- $\alpha$  à long terme, conduisant à des changements phénotypiques des fibres musculaires caractéristiques d'un défaut d'innervation. Ces données supportent notre hypothèse selon laquelle les CS musculaires pourraient jouer un rôle cellule-autonome dans le développement de la SMA.

**Les résultats relatifs à cette partie feront très prochainement l'objet d'un article en cours de préparation, pour une soumission au journal *EMBO Molecular Medicine* (Mecca et al., en préparation).**

#### 4.2.5. Un effort physique modéré déclenche l'apparition d'un phénotype sévère chez les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* sans affecter les MN

##### 4.2.5.1. Un effort physique modéré réduit fortement la survie des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>*



**Figure 22 :** L'effort physique affecte le phénotype général des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>*. (A) Chronogramme de l'expérience. (B) Courbe de survie. (C) Courbe de poids durant les 6 semaines suivant l'injection (D) Courbe de la force moyenne des 4 membres calculée en gramme (g) par semaine sur une durée de 3 semaines. (E) Force spécifique calculée à partir de la force mesurée (g) / par le poids (g) à la même semaine (F) Courbe du temps moyen passé sur l'appareil (rotarod) avant la chute en secondes (s). (G) Photos d'une souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* présentant des signes de paralysie et une cyphose 6 semaines après l'injection. Les valeurs indiquées sont les moyennes +/- s.e.m, 4-6 souris/génotype (Test de Mantel-Cox, \*\*\*p<0.001 ; test ANOVA à un facteur, p<0.05 ; test post hoc de comparaisons multiples de Dunnett, \*p<0.05).

Afin de déterminer si le fait que seule une faible proportion de souris développe un phénotype sévère était dû à un manque de sollicitation du système neuromusculaire en conditions homéostatiques, et d'accélérer l'apparition des défauts du système

neuromusculaire, nous avons soumis des souris adultes mâles  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{+/+}$ ,  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/+}$  et  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  à un protocole d'effort modéré, 1 mois après les injections de tamoxifène (Fig 22). Deux séries de tests ont été réalisées sur 3 semaines consécutives comme suit :

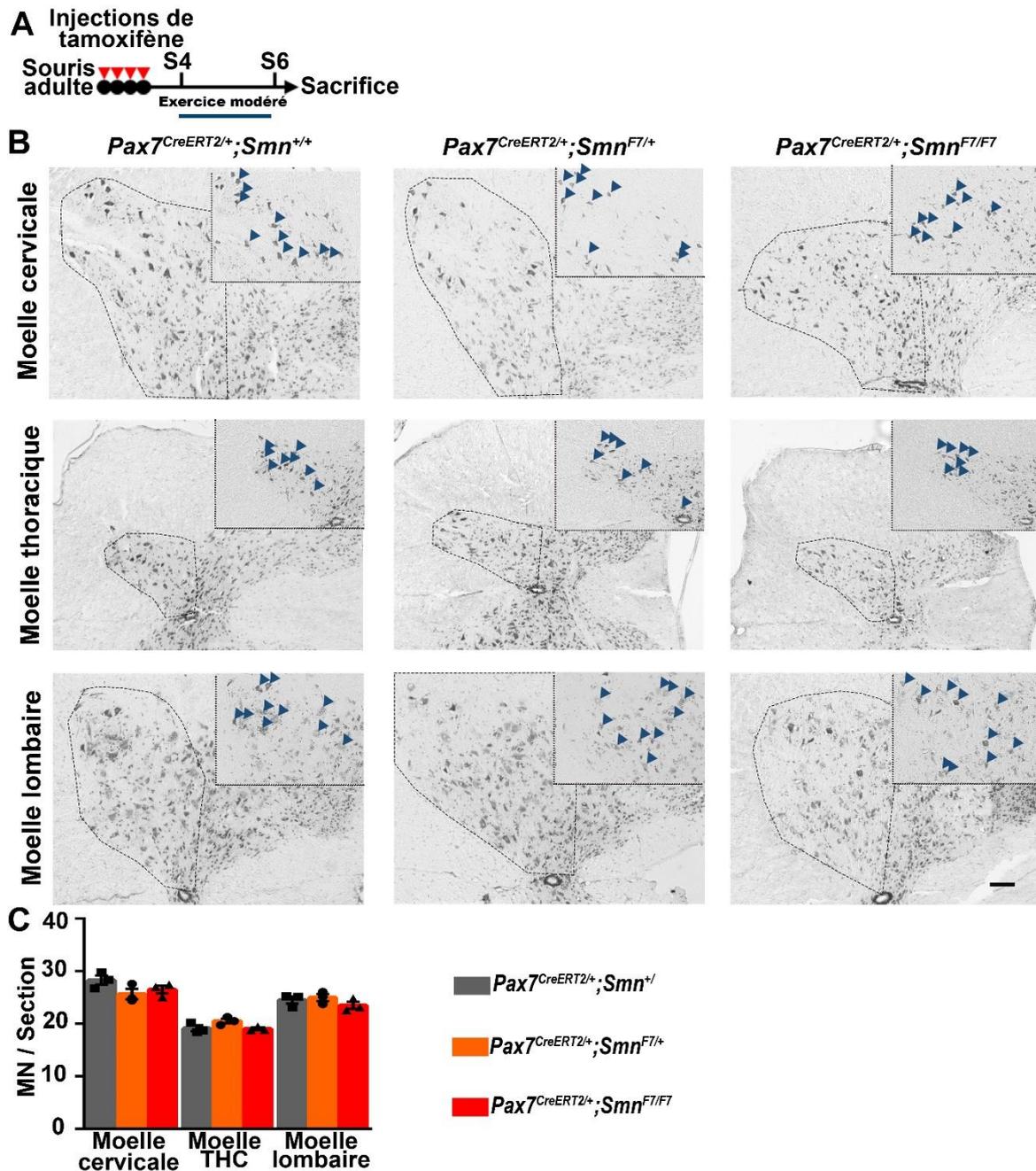
- à J0 : la force de préhension des 4 membres des souris a été mesurée par un grip test, immédiatement après un passage de 5 minutes sur un tapis de course à allure de marche lente (15cm/s).

- à J+2 : un test de suspension sur grille pendant 2 minutes a été réalisé ainsi qu'une évaluation de la coordination motrice sur un rotarod (Fig 22A).

Durant la première semaine du protocole, aucune souris n'a montré de phénotype particulier quel que soit les génotypes. Cependant, dès la seconde semaine, les souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  ont commencé à perdre du poids, à développer une cyphose particulièrement visible lors de la marche et à émettre un claquement vocal immédiatement après l'arrêt de l'exercice pendant plusieurs minutes suggérant des difficultés respiratoires. De plus, deux de ces souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  ont dû être sacrifiées pour des raisons éthiques du fait de leur état particulièrement sévère (Fig 22B-C-G). Au cours de la troisième semaine, le phénotype observé chez les souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  a continué à se dégrader avec une cyphose de plus en plus marquée, un déplacement sur les doigts et non sur la surface palmaire des pattes ainsi qu'une forte perte de poids nous obligeant là encore à sacrifier ces souris. En revanche, malgré ces phénotypes sévères, durant les 3 semaines de protocole, nous n'avons pas observé de différence de la force absolue mesurée par le grip test entre les différents génotypes (Fig 22D). Cependant, il faut noter que nous constatons une augmentation de la force normalisée par le poids corporel total (force spécifique) chez les souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  lors de la 3<sup>ème</sup> semaine du protocole. Cependant, le poids des muscles n'étant pas significativement modifié entre les souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  et les contrôles, nous supposons que la perte de poids corporel est principale due à une diminution du tissu adipeux. Ainsi, cette augmentation de force spécifique n'est donc pas due à une amélioration des capacités musculaires des souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  mais plutôt à cette perte de poids corporel (Fig 22E).

Au cours des 2 premières semaines, nous n'observons aucune différence des temps réalisés sur le rotarod entre les différents groupes ce qui suggère que la coordination motrice des souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  n'est pas affectée et donc que les étages supérieurs du SNC (cervelet) ainsi que l'état de myélinisation des axones des MN ne sont pas affectés (Fig 22G). Enfin lors de la troisième semaine, le phénotype de la quasi-totalité des souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  (5/6) nous a conduit à les sacrifier avant la réalisation du rotarod à J+2.

4.2.5.2. Les souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  soumises à un effort physique modérée développent un phénotype sévère sans perte de MN



**Figure 23 :** Un protocole d'exercice modéré n'affecte pas l'intégrité des MN chez les souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  (A) Chronographe de l'expérience. (B) Photos représentatives des sections de moelles épinières des souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{+/+}$ ,  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/+}$  et  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  colorées par la technique de Niels. (C) Histogramme montrant le nombre de MN par section comptés d'après leur taille et leur localisation comme montré sur (B). Les valeurs sont la moyenne +/- s.e.m de trois quantifications indépendantes (3 souris/génotype). Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

- Le nombre de MN n'est pas modifié par un protocole d'effort physique modéré chez les souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$

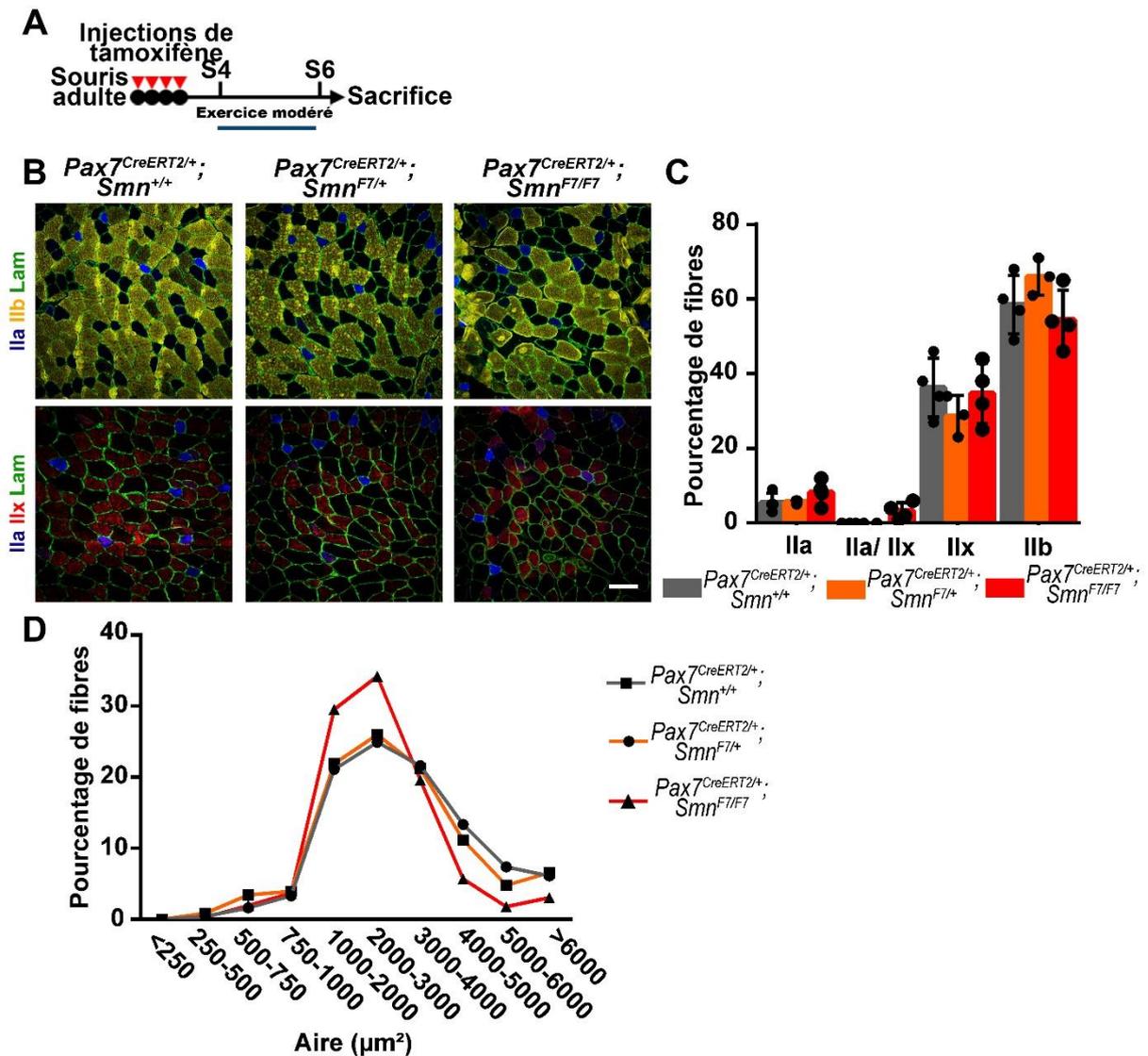
Compte tenu de la sévérité du phénotype observé chez les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/F7</sup>* en réponse au protocole d'exercice physique, nous avons décidé d'analyser plus en détails le système neuromusculaire de ces souris après les 3 semaines de protocole (Fig 23A). Comme nous l'avons fait précédemment, les sections de moelles ont été colorées par la méthode de Niels pour pouvoir identifier les MN selon leur forme et leur localisation dans la corne antérieure (Fig 23B-C, flèches). Nous n'avons observé aucune variation du nombre de MN entre les trois génotypes souris quel que soit le niveau de la moelle analysé (Fig 23C).*

Ces résultats démontrent donc que le phénotype sévère observé est indépendant d'une perte des MN et résulte donc uniquement de la déplétion en CS musculaires.

- **L'effort physique modéré n'affecte pas significativement le phénotype musculaire des muscles TA des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/F7</sup>****

Nous avons ensuite réalisé une analyse de la distribution des fibres musculaires à la 3<sup>ème</sup> semaine de protocole (Fig 24A). Nous n'avons observé aucune différence dans la répartition des différents types de fibres entre les génotypes (Fig 24B-C). Ces résultats sont cohérents avec l'absence de diminution du nombre de MN observée au même moment. Nous avons tout de même noté une légère augmentation des fibres de transition IIa/IIx dans certains TA des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/F7</sup>* pouvant éventuellement révéler l'amorçage de la transition de la distribution des fibres musculaires.*

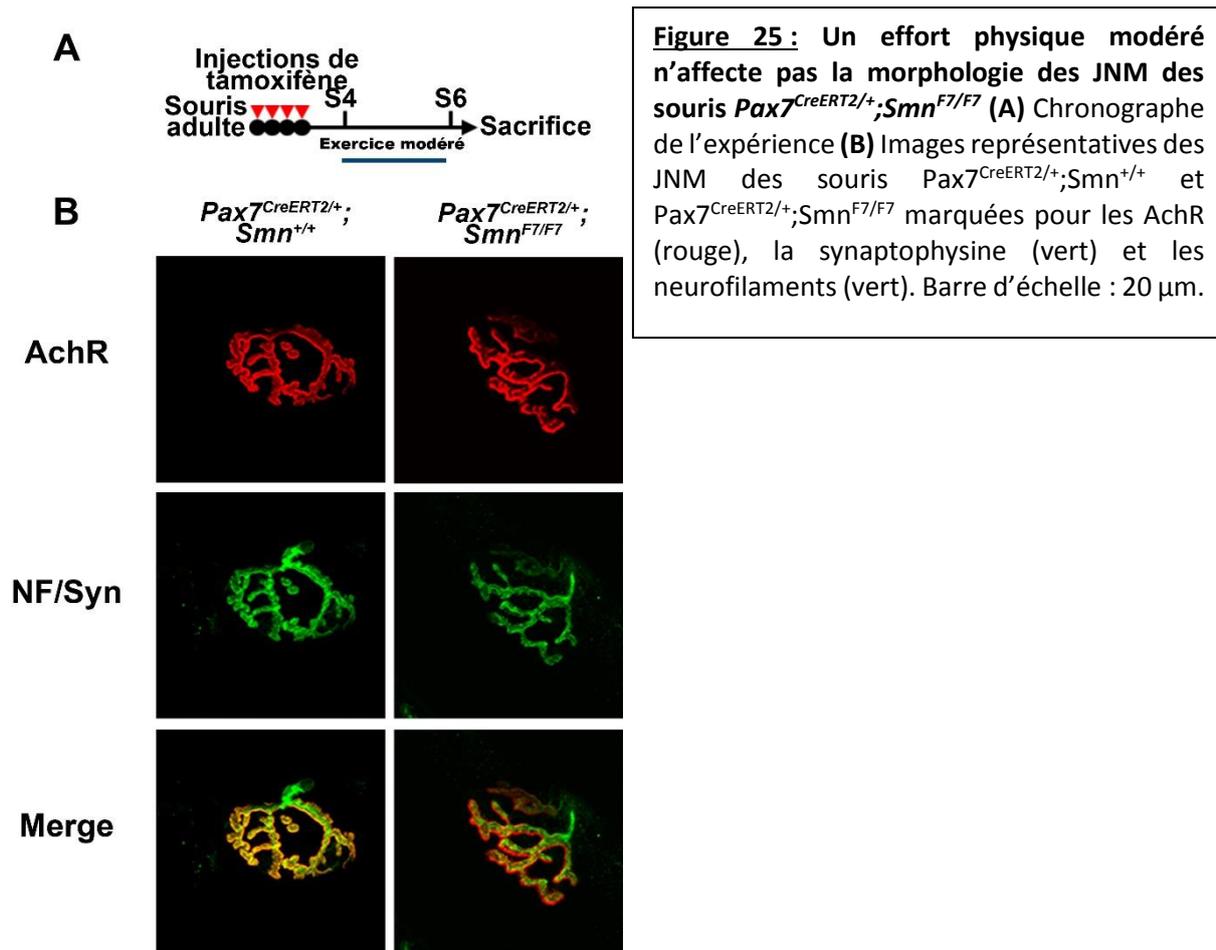
Enfin, la mesure de l'aire des fibres par le logiciel MuscleJ révèle une augmentation de la proportion de fibres comprises entre 1000 et 3000  $\mu\text{m}^2$  associée à une diminution des fibres comprises entre 4000 et 6000  $\mu\text{m}^2$  dans les muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/F7</sup>* par rapport aux souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>+/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn<sup>F7/+</sup>* suggérant un début d'atrophie musculaire (Fig 24D). Cependant, ces variations de la taille des fibres ne sont pas statistiquement significatives d'après le test de Kruskal Wallis. Ces résultats sont donc en accord avec d'autres études portant sur l'effet de la déplétion des CS sur le muscle soumis à un exercice modéré qui ne montrent aucune variation de l'aire des fibres (Jackson et al., 2015; Murach et al., 2017; Sambasivan et al., 2011).***



**Figure 24 :** Un exercice modéré sur une courte période induit une diminution de l'aire des fibres sans modification du phénotype musculaire chez les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*. (A) Chronographe de l'expérience. (B) Photos représentatives des TA des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* immunomarquées par des anticorps dirigés contre les fibres Ila (bleu), Iix (rouge), Iib (jaune) et la laminine (vert). (C) Histogramme montrant la répartition des fibres dans le TA comme montré en (B). (D) Aire des fibres en µm<sup>2</sup> mesurée par la macro MuscleJ fonctionnant avec le logiciel ImageJ. Les valeurs sont la moyenne +/- s.e.m de quantifications indépendantes (au minimum trois souris/génotype). Barre d'échelle : 100 µm.

#### 4.2.5.3. Les JNM ne présentent pas de défauts morphologiques dans les muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* soumises à un effort physique modéré

Nous avons pour finir réalisé une analyse morphologique des JNM (Fig 25A). Comme précédemment, les fibres isolées du TA ont été marquées par l'α-bungarotoxine pour identifier les AchR et avec un mix d'anticorps dirigés contre les neurofilaments (NF) et la



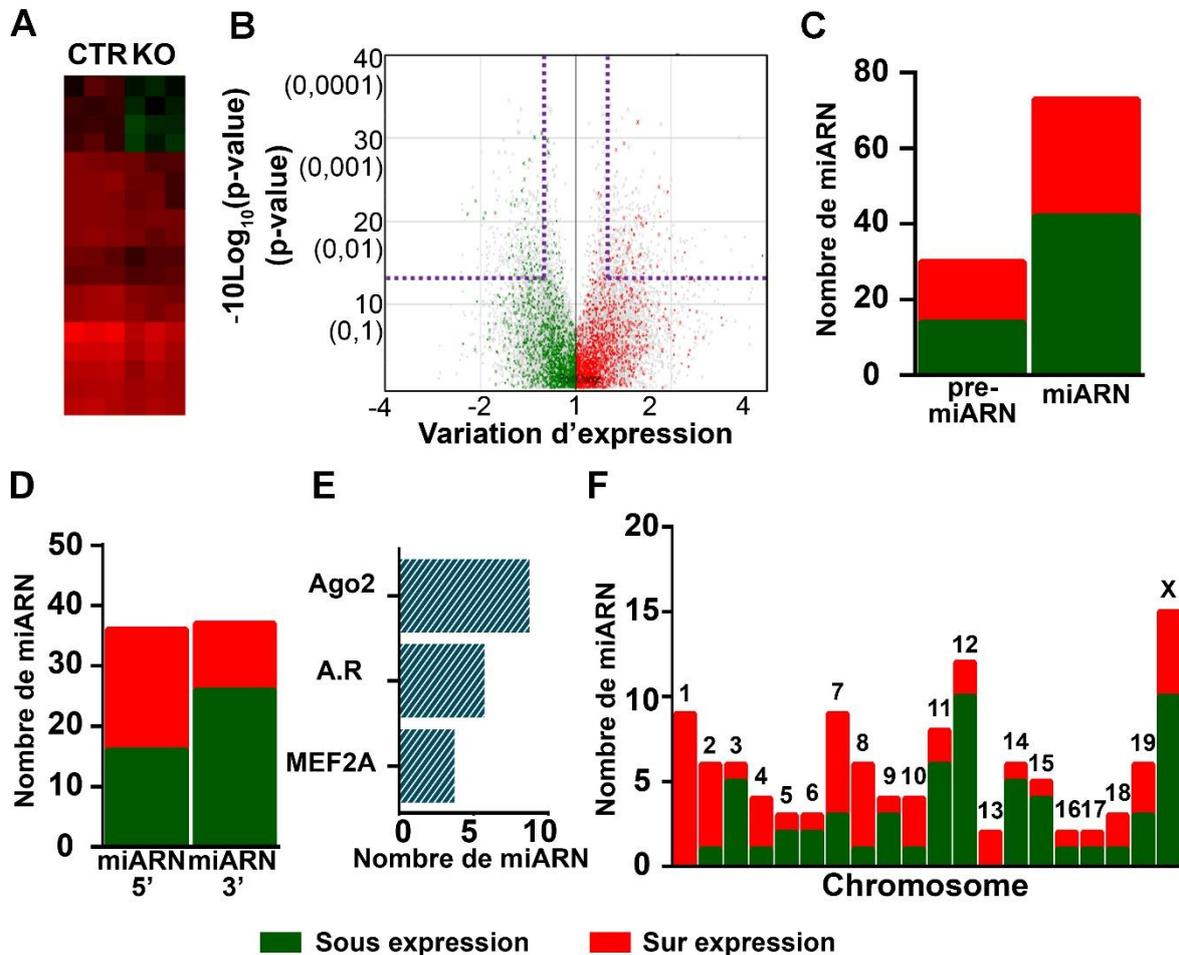
**Figure 25 : Un effort physique modéré n'affecte pas la morphologie des JNM des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* (A) Chronographe de l'expérience (B) Images représentatives des JNM des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* marquées pour les AchR (rouge), la synaptophysine (vert) et les neurofilaments (vert). Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.**

synaptophysine (Syn) pour respectivement marquer les axones et la partie terminale des nerfs (Fig 25A). Nous n'avons constaté aucune différence de morphologie des JNM entre les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* (Fig 25B). Des résultats identiques ont été obtenus sur d'autres muscles tels que l'EDL, le soléaire et le diaphragme. Ces données sont en accord avec les valeurs des tests moteurs effectués sur les souris durant la phase d'entraînement et indiquent donc que le phénotype sévère observé est indépendant de défauts des JNM.

Nos résultats montrent donc qu'un effort physique modéré conduit à l'apparition rapide d'un phénotype sévère et à une réduction significative de la durée de vie des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* sans atteinte apparente des JNM, ni de perte de MN. Par conséquent, ce phénotype est uniquement dû à la déplétion des CS induite par le déficit en SMN. De plus, les analyses que nous avons réalisées sur les muscles des pattes de ces souris, n'ont montré qu'une légère atrophie musculaire non significative, sans changements du phénotype des fibres musculaires et sans diminution de la force de préhension. Bien que des analyses plus poussées soient nécessaires pour conclure quant à la cause exacte de la mort prématurée de ces souris, nous supposons qu'elle est probablement liée aux difficultés respiratoires que nous avons observées juste après l'effort. D'autre part, ces expériences confirment que la perte des MN que nous observons chez les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* en conditions homéostatiques, est un processus progressif dans le temps, qui n'est pas dépendant du degré de sollicitation du système neuromusculaire.

### 4.3. Etude des mécanismes moléculaires en aval de SMN dans les CS musculaires

#### 4.3.1. Le profil d'expression des miARN est perturbé dans les CS des souris SMA



**Figure 26 :** Identification des miARN dérégulés dans les CS purifiées à partir des souris SMA très sévères hSMN2 par analyse transcriptomique sur puce. (A) Heatmap de l'expression des miARN sur (rouge) et sous (vert) exprimés dans les CS des souris CTR et SMA. (B) Volcanoplot des miARN détectés dans l'analyse transcriptomique, le seuil est marqué par les lignes pointillées (facteur de changement  $>1,3$  ou  $<-1,3$ ,  $p<0,05$ ). (C) Histogramme présentant pré-miARN et miARN dérégulés. (D) Histogramme montrant la sous expression majoritaire des miARN provenant du brin 3' comparé au brin 5' (test du  $\chi^2$ ,  $p<0,05$ ). (E) Histogramme des principaux ARNm cibles des miARN dérégulés. (F) Histogramme de la répartition des miARN dérégulés selon leur position sur les chromosomes. 3 souris/génotype.

Nos résultats montrent une nouvelle fonction de SMN dans la régulation des CS. Du fait, d'une part du rôle central de la voie des miARN dans la régulation de CS et d'autre part de l'existence de plusieurs travaux montrant la dérégulation de plusieurs séquences de miARN dans la SMN, nous avons choisi d'explorer cette voie dans les CS SMA. Pour cela, nous avons réalisé une analyse transcriptomique de l'expression de pré-miARN et miARN dans les CS du modèle murin SMA très sévère (hSMN2) 1 jour après la naissance, soit lorsque les premières dérégulations de la myogénèse post natale ont été observées. Les miARN ont été extraits à partir de CS isolées par cytométrie de flux par les marqueurs de surface classique CD34 et  $\alpha 7$ -

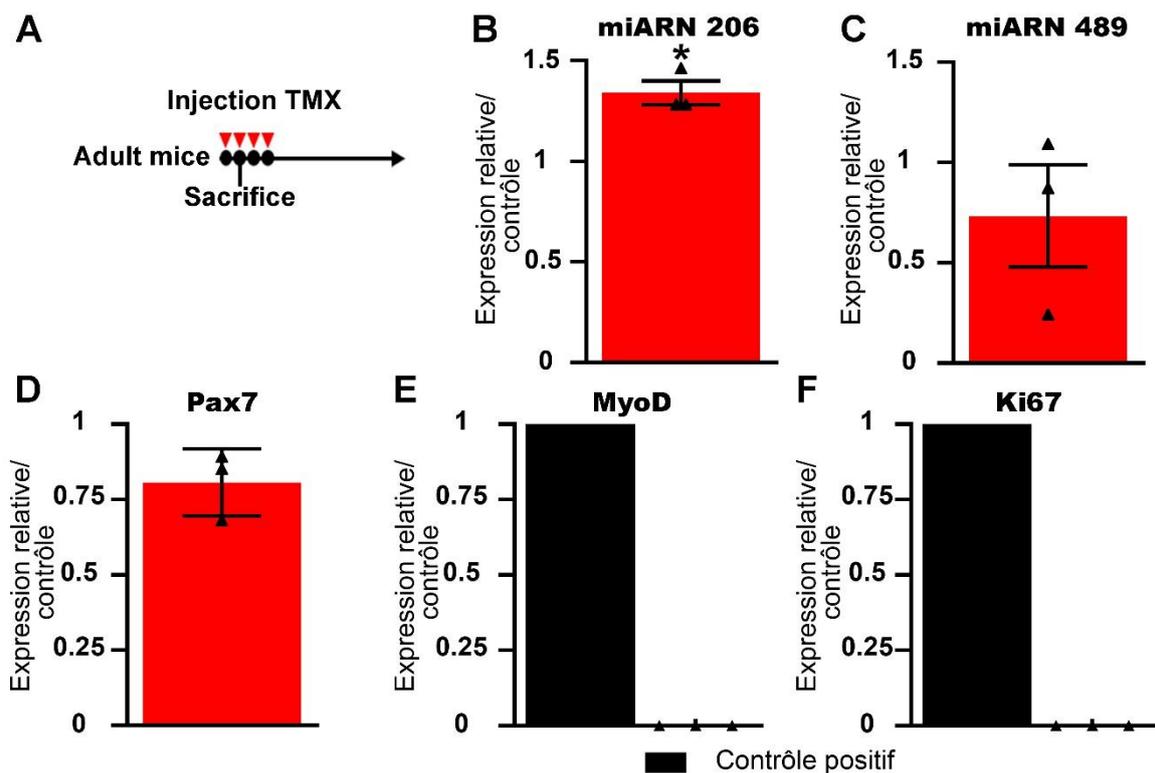
intégrine comme montré précédemment. L'analyse de l'expression des miARN a été réalisée sur une puce Affymétrie permettant la détection de 1908 miARN matures et 1255 pré-miARN chez la souris représentés sur la heatmap (Fig 26A). La mesure de l'expression des séquences a été réalisée par la plateforme de génomique de l'Institut Curie et l'analyse bio-informatique par Nicolas Cagnard à Necker. En établissant un seuil pour de variation d'expression de 1,3 des CS SMA par rapport au contrôle et une  $p.value < 0.05$ , nous avons identifié 103 séquences dérégulées (47 sur exprimées, 56 sous exprimées, Fig 26B).

A partir de ces séquences nous avons réalisé une analyse bio-informatique avec pour objectif de comprendre les dérégulations observées et de potentiellement identifier de nouveaux miARN associés aux défauts des CS. Nos données nous montrent que la majorité des séquences dérégulées proviennent de miARN matures avec 74 miARN dérégulés contre 29 pré-miARN (Fig 26B-C). Aussi nous observons des proportions similaires entre les séquences sur exprimées et sous exprimées pour les pré-miARN et les miARN : 16 séquences sur exprimées vs 13 sous exprimées pour les pré-miARN et 31 séquences sur exprimées vs 43 sous exprimées pour les miARN (Fig 26C). Collectivement ces données montrent que les étapes d'expression et de coupure des pré-miARN en miARN ne sont pas perturbées.

Dans la nomenclature, les miARN matures sont terminés par 5' ou 3' référant au brin dans la séquence du pré-miRNA se terminant par le 5' phosphate soit par le 3' OH. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le choix du brin guide est effectué par la cellule lors du chargement du miARN mature dans le complexe RICS. Nous avons donc approfondi nos analyses pour identifier des potentiels défauts dans la maturation terminale des miARN. D'après nos résultats, la majorité des miARN provenant du brin 3' sont sous exprimés alors qu'il n'y a pas de différences entre les séquences sur et sous exprimées originaires du brin 5' (5' : 55% sur exprimés, 45% ; 3' : 30% sur exprimés, 70% sous exprimés, Fig 26D). Cette différence est statistiquement significative d'après le test du  $\chi^2$  et indique un défaut dans la prise en charge terminale du brin guide dans les CS SMA.

Nous avons analysé *in silico* les ARNm cibles des miARN dérégulés à l'aide des outils Affymétrie et Target Scan (Fig 26E). D'après leur séquence, trois ARNm sont la cible d'au moins 4 miARN dérégulés : l'ARNm de MEF2A impliqué dans la régulation de la myogénèse (4 séquences, Liu et al., 2014), l'ARNm des récepteurs aux androgènes (A.R) également dans le contrôle des CS et dont la dérégulation de l'expression du gène est à l'origine de l'amyotrophie spino bulbaire (6 séquences, Chen et al., 2005; Cortes and La Spada, 2018; Dubois et al., 2014) et l'ARNm d'Ago2 qui est impliqué dans la prise en charge du miARN dans le complexe RISC (9 séquences).

Nous avons ensuite caractérisé l'origine chromosomique des séquences des pré-miRNA et miARN dérégulés. Les résultats révèlent la présence de séquences dérégulées sur l'ensemble des chromosomes excepté les chromosomes 20 et 21 (Fig 26F). Nous observons également que près de 50% des séquences dérégulées proviennent des chromosomes 1, 7, 11, 12 et X. Parmi ces chromosomes, il apparaît que le chromosome X contienne la plus grande proportion



**Figure 27 : La perte de *Smn* entraîne la dérégulation des myo-miR 206-489 sans activation des CS 24h après la première injection de tamoxifène. (A)** Chronographe de l'expérience **(B et C)** Analyse de l'expression relative des miR206 (B) et 489 (C) dans les CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* comparé aux CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>* par RT-qPCR. **(D, E et F)** Expression des marqueurs des SC, Pax7 (D) et d'activation, MyoD-Ki67 (E-F) dans les CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* comparé aux CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>* par RT-qPCR. Les histogrammes noirs sont les contrôles positifs (CS 1 jour après la naissance). Les valeurs sont la moyenne de trois quantifications indépendantes +/- s.e.m. La significativité statistique est calculée par un test de Student, \* $p < 0.05$ .

de séquences dérégulées (15 séquences). Étonnamment, toutes les séquences provenant du chromosome 1 (9 séquences) sont sur exprimées dans les CS SMA par rapport au contrôles. Collectivement, ces données laissent supposer que des défauts de régulations épigénétiques pourraient être à l'origine de la dérégulation de l'expression de certains miARN.

Notre analyse nous montre que la voie de maturation des miARN reste fonctionnelle malgré la réduction de SMN dans les CS hSMN2. Cependant, les profils d'expressions observés suggèrent des défauts dans la prise en charge finale des miARN conduisant à la dérégulation de certains miARN. Enfin l'analyse de ces données révèle la dérégulation de groupes de miARN ciblant ARNm corrélé à la physiopathologie de la SMA et des CS. La perte de SMN dérégule la voie des miARN indépendamment de l'état d'activation des CS

Nos résultats nous montrent une dérégulation de la voie des miARN dans les CS de souris SMA sévère 1 jour après la naissance. Cependant, comme décrit précédemment, nous avons observé des défauts de la myogénèse post-natale dans ces souris. La perturbation des miARN pourrait donc être la conséquence directe de la perte de SMN et/ou la conséquence des défauts de myogénèse post natal. Pour élucider ce point, nous avons tiré profit de notre

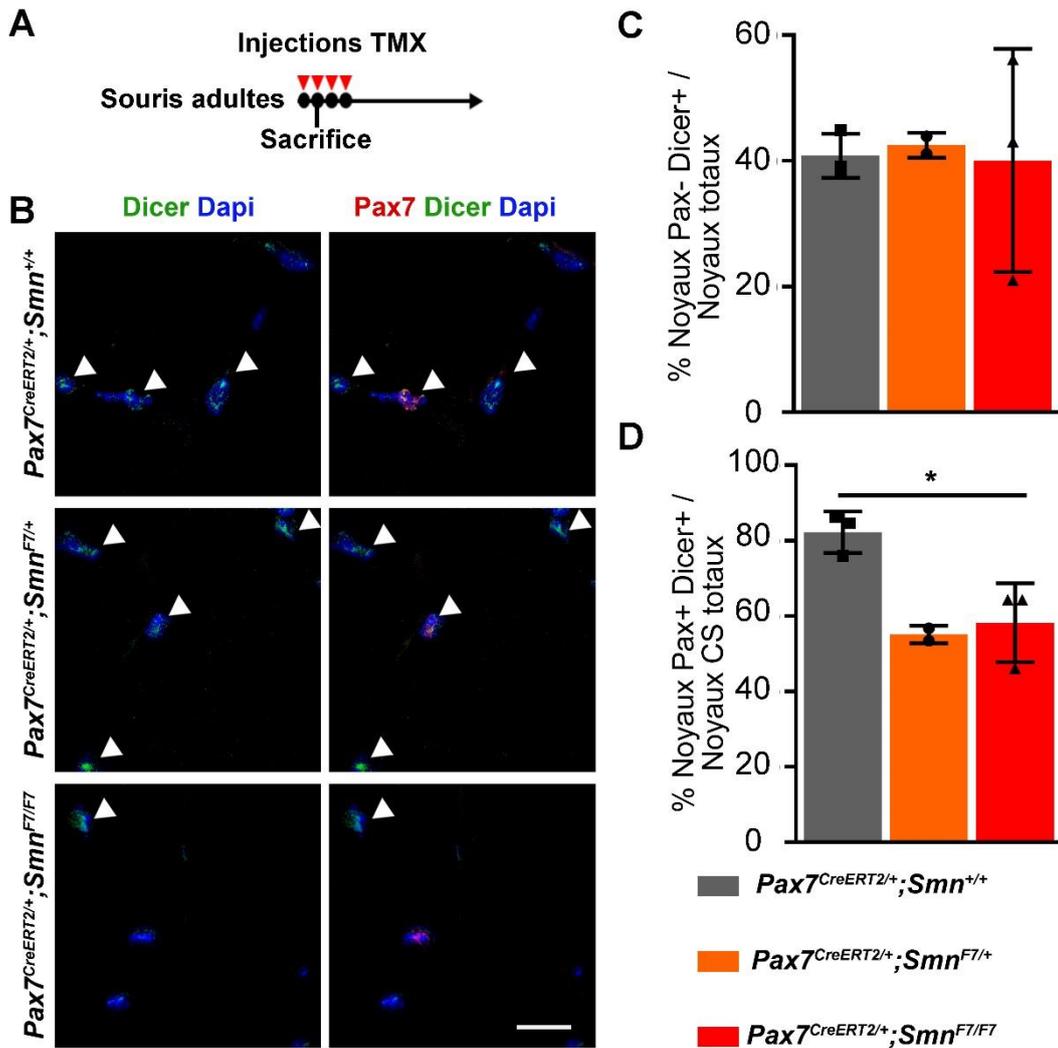
modèle *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* pour analyser la voie des miARN uniquement dans les CS. Comme nous l'avons vu précédemment, la perte de *Smn* CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* entraîne très rapidement l'apoptose des cellules après induction de la recombinaison. Pour pouvoir étudier la voie des miARN dans ce modèle nous avons sacrifié les souris quelques heures après la seconde injection de tamoxifène (Fig 27A). Nous avons choisi d'étudier l'expression par RT-qPCR sur des CS purifiées par cytométrie de flux de 2 miARN fortement associés aux CS : le miARN 489 dont l'expression est retrouvée dans les CS quiescentes (Fig 27B, Cheung et al., 2012) et le miARN 206 impliqué dans le passage de l'étape de différenciation à la prolifération (Fig 27C, Dey et al., 2011).

Nos résultats indiquent une diminution de l'expression relative de 30% de l'expression du miARN 489 dans les CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* par rapport au contrôle *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>+/+</sup>* (Fig 27B). A l'inverse pour le miARN 206, nous constatons une augmentation statistiquement significative de son expression dans les CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* de 30% par rapport au contrôle *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>+/+</sup>* ( $p < 0.05$ , test de Student, Fig 27C). Le profil d'expression que nous observons pour ces 2 miARN est classiquement associé à une sortie de quiescence (diminution du miARN 489) et à l'entrée dans le processus de prolifération/différenciation des CS (induction du miARN 206 par le facteur de différenciation *MyoD*). Nous avons donc mesuré l'expression par RT-qPCR des ARNm de *Pax7*, *MyoD* et *Ki67* sur ces cellules. Nous observons une légère diminution de l'expression de *Pax7* dans les CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* (Fig 27D). Cependant nous n'observons aucune expression de *MyoD* et *Ki67* avec comme contrôle positif des CS purifiées de souris au premier jour après la naissance, soit lors de la myogénèse post natale (Fig 27E-F). Ces résultats montrent que la dérégulation de l'expression des miARN dans les CS peut être directement liée à la perte de SMN et non à l'état de la cellule.

#### **4.3.2. La localisation nucléaire de Dicer 1 dans les CS est perturbée par la perte de SMN**

Nos données et les données de la littérature, indiquent un possible lien entre SMN et la voie de biogenèse des miRNA. Comme mentionné en introduction, une nouvelle fonction nucléaire de Dicer 1 a été récemment décrite (Doyle et al., 2013; White et al., 2014). Dicer 1 serait impliqué dans l'élimination des ARN doubles brins (dsARN) dans le noyau cellulaire. En effet, la perte de localisation nucléaire de Dicer 1 conduit à une accumulation des dsARN induisant la voie des interférons et l'apoptose de la cellule (White et al., 2014). Etant donné que SMN est capable d'interagir directement avec Dicer 1 (Joshi et al., 2013), nous avons exploré la possibilité qu'une réduction de SMN pourrait affecter la localisation cellulaire de Dicer 1.

Pour cela nous avons analysé la localisation de Dicer 1 dans les CS *Pax7+* et les autres cellules *Pax7-* par immunofluorescence sur des sections de muscles de souris



**Figure 28 :** L'induction de la délétion de *Smn* conduit à la perte de localisation nucléaire de Dicer 1 dans les CS in vivo. (A) Chronographe de l'expérience. (B) Photos représentatives des coupes de muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* immunomarquées pour Pax7 (rouge) et Dicer 1 (vert). Les noyaux sont marqués par le DAPI. (C-D) Histogrammes de la quantification des cellules Pax7- Dicer 1 nucléaire (C) et des cellules Pax7+ Dicer 1 nucléaire (D) quantifiées comme montré en (B). Les flèches indiquent les cellules caractérisées par un marquage nucléaire de Dicer 1. Les valeurs sont la moyennes +/- s.e.m des valeurs de quantifications indépendantes réalisées sur 3 souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, 2 souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et 3 souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* (test de Student non apparié, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>* vs *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* \*  $p < 0.05$ ). Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

*Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* quelques heures après la seconde injection de tamoxifène c'est-à-dire juste avant l'induction de l'apoptose en réponse au déficit en SMN (Fig 28A-B). L'analyse des noyaux Pax7-, montre une proportion identique d'environ 40% de noyaux Dicer 1+ entre les différents génotypes SMN (Fig 28C). Fait particulièrement intéressant, plus de 80% des CS Pax7+ montrent un marquage nucléaire de Dicer 1 dans les muscles des souris contrôles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, laissant supposer une fonction particulière de Dicer 1 dans les CS quiescentes SMN (Fig 28D). En revanche, dans les muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*, nous constatons une

diminution de cette proportion avec environ 45% de CS Pax7+ présentant un marquage nucléaire de Dicer 1 SMN (Fig 28D). Le nombre d'échantillon des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* (n=2) ne nous permet pas de réaliser de test Anova, cependant quand le test de Student est réalisé sur les mesures des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*, la réduction du nombre de CS avec un marquage nucléaire de Dicer 1 est significative.

Bien que des expériences supplémentaires soient nécessaires pour mieux comprendre la signification biologique de ces observations, ces analyses suggèrent que : (1) Dicer 1 pourrait avoir un rôle nucléaire particulier dans les CS quiescentes, (2) la diminution de SMN dans les CS pourrait perturber la localisation nucléaire de Dicer 1. En nous basant sur les données de la littérature, nous supposons, que cette perte de localisation nucléaire de Dicer 1 dans les CS pourrait conduire à une accumulation nucléaires des ARNs doubles brins (dsARN), conduisant à l'activation de la voie de réponse aux interférons et à l'apoptose des cellules (White et al., 2014).

## V. Discussion



Les atteintes du système neuromusculaire sont à l'origine de nombreuses pathologies dont la plupart restent encore sans traitements efficaces. Parmi ces pathologies, la SMA apparaît être une des plus sévères du fait de sa prévalence élevée et de la sévérité de ses symptômes (dégénérescence des MN et atrophie musculaire) conduisant au décès prématuré des patients dans les formes les plus graves. Historiquement, la SMA a longtemps été considérée comme une maladie purement neuronale et les défauts musculaires comme étant la conséquence directe de cette atteinte neuronale. Ainsi, suite à l'identification du gène *SMN1*, de nombreux travaux de recherche ont cherché à identifier les mécanismes conduisant à une mort sélective des motoneurons en réponse à la diminution d'une protéine ubiquitaire. Cependant, bien que les MN soient indiscutablement la principale cible cellulaire de la pathologie, une accumulation de données démontrent que le déficit en SMN affecte également les tissus périphériques, dont le muscle squelettique et les cellules souches musculaires, faisant apparaître la SMA comme une maladie multi-systémique en particulier dans ses formes les plus sévères. De même, la restauration de SMN ciblée spécifiquement dans les MN (Gavrilina et al., 2008; Hua et al., 2011, 2015; Martinez et al., 2012; Paez-Colasante et al., 2013) ou encore l'inhibition de l'apoptose dans les MN de souris SMA (Van Alstyne et al., 2018), ne permettent pas de rétablir une durée de vie normale.

En parallèle de ces travaux visant à mieux appréhender la physiopathologie de la maladie, des progrès considérables, en grande partie portés par la recherche académique, ont été accomplis en termes de traitements, conduisant aux premiers succès thérapeutiques pour les patients atteints de SMA type I, moins de 25 ans après l'identification du gène *SMN1*. En effet, en 2016, le Nusinersen, un oligonucléotide anti-sens (ASO) administré par voie intrathécale, a été le premier médicament à recevoir une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la SMA. De plus, la découverte par notre équipe de la capacité des vecteurs scAAV9 à transduire efficacement les MN après une simple injection systémique (Barkats, 2009; Duque et al., 2009), a été le point de départ du développement des stratégies de thérapie génique basées sur l'injection IV d'un vecteur scAAV9-SMN1 (Dominguez et al., 2011; Foust et al., 2010; Valori et al., 2010). Grâce à l'ensemble de ces travaux, le premier essai clinique de thérapie génique pour des patients SMA de type I, a été lancé en 2014 par AveXis. Au vu des résultats particulièrement impressionnants de cet essai (Mendell et al., 2017), en termes d'amélioration de l'espérance de vie et des capacités motrices des patients, d'autres essais ont d'ores et déjà été initiés ou le seront très prochainement.

Cependant, malgré ces résultats très prometteurs, des incertitudes persistent sur l'efficacité à long terme de ce type de traitements en particulier en ce qui concerne la préservation du système neuromusculaire. En effet, une transduction inefficace et/ou inappropriée des tissus et organes périphériques ou une administration trop tardive du traitement risquent de réduire la gravité de la maladie sans pour autant la guérir complètement et par conséquent de favoriser à long terme une dégradation du système neuromusculaire ou d'autres organes périphériques. Il semble donc important de mieux appréhender la physiopathologie de la SMA, en particulier le rôle des tissus périphériques

dans la progression de la maladie, pour développer des stratégies thérapeutiques combinant la restauration de SMN et le maintien de l'intégrité du système neuromusculaire tout au long de la vie du patient.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit ce travail de thèse, dont les principaux objectifs étaient : de mieux définir le rôle de SMN dans la régulation des cellules souches musculaires, d'évaluer un rôle potentiel des CS musculaires dans la physiopathologie de la SMA, et enfin d'explorer une possible interaction entre SMN et la voie de biogenèse des miARN avec comme objectif à plus long terme d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques au niveau musculaire.

### **SMN est impliquée dans l'établissement du pool de CS quiescentes au cours de la myogenèse post-natale et le maintien de l'intégrité de ce pool dans le muscle adulte**

Les analyses post-mortem de biopsies musculaires néonatales de patients SMA type I, rapportent une augmentation du nombre de CS suggérant un défaut de la myogenèse post-natale (Martínez-Hernández et al., 2009; Soler-Botija et al., 2002). Afin d'évaluer l'impact du déficit en SMN à des temps plus tardifs de la myogenèse post-natale, nous avons quantifié la population de CS dans des muscles de patients SMA de type II et de patients contrôles ne présentant pas de pathologie neuromusculaire, âgés d'au moins 10 ans. Toutes les biopsies incluses dans notre étude ayant été obtenues lors d'une intervention chirurgicale de la colonne vertébrale, il est possible que ces muscles aient soufferts de la déformation de la colonne ce qui pourrait affecter le nombre de CS. Bien que nos analyses histologiques n'aient révélé aucun signe de dégénérescence/régénération, ou de fibrose dans les biopsies de patients contrôles contrairement aux muscles de patients SMA, nous ne pouvons pas totalement exclure cette hypothèse. Toutefois, le nombre de cellules Pax7+ pour 100 fibres dans nos biopsies contrôles est comparable à celui décrit dans le muscle vaste latéral (quadriceps) d'individus sains suggérant que le pool de CS n'a pas été affecté par la scoliose (Mackey et al., 2009). Nos analyses nous ont permis de mettre en évidence une diminution significative du nombre de CS Pax7+ dans les muscles de patients SMA par rapport aux muscles de patients contrôles quelle que soit la méthode de normalisation utilisée (par 100 fibres ou par champs). En complément, nous avons exploré l'état d'activation des CS en réalisant des co-marquages pour MyoD et pour le marqueur de prolifération Ki67. Nous n'avons observé aucune CS positive pour MyoD ou Ki67 dans les biopsies contrôles, suggérant qu'à ce stade de la croissance post-natale, les CS sont majoritairement quiescentes. Etonnament, aucun signe d'activation des CS n'a pu être mis en évidence dans les biopsies de patients SMA malgré les signes de dégénérescence/régénération. N'ayant pas de biopsies de patients plus jeunes comme contrôles positifs, nous ne pouvons pas exclure un problème d'ordre technique pour expliquer ces résultats. Une autre explication pourrait être que les cycles de dégénérescence/régénération surviennent essentiellement au cours des phases précoces de la croissance post-natale puis diminuent en raison d'un épuisement du pool de CS et/ou du remplacement du tissu musculaire par de la fibrose et du tissu adipeux. D'autre part, Il aurait bien entendu été intéressant de réaliser ces analyses sur des muscles proximaux, qui sont les

premiers muscles touchés par la pathologie, cependant, compte tenu de la difficulté d'obtention de tels échantillons et de leur rareté, cela n'a pas été possible pour notre étude. Au total, nos observations suggèrent que le déficit en SMN conduit à une réduction du pool de CS Pax7+ quiescentes dans les phases tardives de la myogenèse post-natale. Cette diminution pourrait avoir plusieurs origines : (1) l'épuisement du pool de CS en raison de cycles répétés de dégénérescence/régénération, (2) une perte de la capacité des CS déficientes en SMN à entrer en quiescence compromettant l'établissement du pool de CS, (3) une perte des CS par apoptose.

Pour tester ces différentes hypothèses, nous avons réalisé une caractérisation plus complète du comportement des cellules souches musculaires au cours de la myogenèse post-natale du modèle de souris SMA très sévère hSMN2, en analysant l'expression des marqueurs myogéniques Pax7, MyoD et MyoG par immunofluorescence. Nos analyses montrent une augmentation du nombre de cellules Pax7+MyoD+, associée à une diminution du nombre de cellules Pax7+MyoD- et de cellules MyoD+MyoG+. Ces données montrent que le déficit en SMN induit une augmentation de la prolifération des CS musculaires compromettant leur engagement vers la quiescence ou vers la différenciation au cours de la myogenèse post-natale. Ces défauts de différenciation et de prolifération des CS dans les muscles de souris hSMN2 ont également été rapportés par l'étude de Hayhurst et ses collaborateurs (Hayhurst et al., 2012). En revanche, dans cette étude les auteurs rapportent une légère augmentation du nombre de CS Pax7+MyoD- contrairement à nos observations. Cette différence est probablement due au fait que cette étude a été réalisée plus tôt au cours de la myogenèse post-natale (P2), alors que nos analyses ont été faites à P4. Fait intéressant, les défauts que nous observons sur les CS musculaires déficientes en SMN, ont également été rapportés dans d'autres types de cellules souches. En effet, les cellules souches neurales dérivées d'embryons de souris SMA montrent une augmentation de prolifération par rapport aux cellules sauvages (Luchetti et al., 2015).

Au total, l'augmentation du nombre de CS observée dans les muscles de patients SMA en période néonatale pourrait donc s'expliquer par une augmentation de leur taux de prolifération directement due au déficit en SMN. Puis à des stades plus tardifs de la myogenèse post-natale, la diminution du pool de CS Pax7+ quiescentes que nous observons, pourrait résulter d'un défaut d'entrée en quiescence des CS déficientes en SMN compromettant la constitution du pool de CS associé à un épuisement du pool de CS causé par des cycles répétés de dégénérescence/régénération. D'un point de vue plus général, nos données associées aux données de la littérature suggèrent que SMN pourrait être un acteur important dans la biologie des cellules souches, notamment dans l'engagement des cellules vers l'auto-renouvellement ou vers la différenciation.

Afin de mieux définir le rôle de SMN dans la régulation des CS et de pouvoir s'affranchir de l'influence des MN sur le tissu musculaire, pour la suite de notre étude nous avons généré un modèle murin KO conditionnel inducible *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>*, permettant l'invalidation du gène *Smn* dans les CS Pax7+ par injection de tamoxifène. Compte tenu du rôle bien décrit de

SMN dans la survie cellulaire (Schrank et al., 1997; Simic et al., 2000; Soler-Botija et al., 2002; Tews and Goebel, 1996), et de la présence de CS apoptotiques observées en microscopie électronique dans les muscles de souris SMA (Dachs et al., 2011), nous nous sommes posés la question de savoir si la diminution du nombre de CS que nous observons dans les muscles de patients SMA pouvait également être due à une mort par apoptose de ces cellules.

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une étude cinétique de l'apoptose lors de l'induction de la recombinaison dans les CS purifiées à partir de muscles de souris adultes *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*. Nous observons une augmentation de la proportion de CS apoptotiques dans les muscles des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* par rapport aux contrôles, qui s'accroît et devient significative chez les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* dès la troisième injection de tamoxifène. En accord avec cette mort par apoptose accrue, nous observons une déplétion du pool de CS Pax7+ de l'ordre de 60% dans les muscles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et de 85% dans les muscles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*, 1 mois post-TMX. Collectivement, ces données montrent que l'ablation d'un seul allèle de *Smn* est suffisante pour induire l'apoptose des CS quiescentes, et donc qu'un niveau élevé de SMN est nécessaire à la survie de ces cellules dans le muscle adulte. Cependant, il est important de souligner que dans notre modèle murin, un des allèles du gène *Pax7* est inactivé par l'insertion du gène *CreERT2*. Bien que la nécessité de *Pax7* pour la survie des CS ait été bien caractérisée au cours du développement embryonnaire et de la croissance post-natale (Relaix 2006-Seale P 2000), son rôle dans la survie des CS quiescentes à l'âge adulte est moins clairement établi (Lepper 2009- Von Maltzahn J 2013). Nous ne pouvons donc pas totalement exclure que la mort des CS soit induite par un effet cumulatif de la diminution de *Pax7* et de SMN. Afin d'écartier cette hypothèse, des expériences similaires pourraient être réalisées en utilisant le modèle transgénique *Pax7-CreERT2* généré par le laboratoire de Gabrielle Kardon (Murphy 2011).

Nos expériences nous ont donc permis de mettre en évidence un nouveau rôle de SMN dans la maintenance du pool de CS quiescentes dans le muscle adulte. Ainsi, la mort par apoptose des CS quiescentes déficientes en SMN pourrait également contribuer à la diminution du nombre de CS Pax7+ observée chez les patients SMA.

### **La perte des CS musculaires consécutive au déficit en SMN induit à long terme une perte sélective des MN- $\alpha$ de la corne ventrale de la moelle épinière**

Nos résultats montrent que SMN est un acteur important de la régulation des CS musculaires au cours de la période post-natale et à l'âge adulte. La deuxième partie de ce travail de thèse a donc consisté à évaluer l'impact de ces défauts des CS musculaires sur le développement de la SMA. En d'autres termes, nous avons cherché à savoir si la perte des CS consécutive au déficit en SMN pouvait en elle-même affecter les autres éléments du système neuromusculaire atteints au cours de la maladie, à savoir les JNM et les MN.

Dans cette optique, nous avons généré un modèle murin rapporteur *Pax7<sup>CreERT2</sup>;Rosa26-mTmG*, afin de vérifier l'absence de recombinaison dans le SNC et plus particulièrement dans

les MN. En effet, plusieurs études ont montré l'expression de Pax7 par hybridisation *in situ* et par immunofluorescence dans le SNC en particulier au cours du développement embryonnaire. Une première étude a montré la présence de transcrits de Pax7 dans plusieurs zones du cerveau durant l'embryogénèse et à l'âge adulte (Stoykova and Gruss, 1994). Plus récemment, de nombreuses études ont démontré l'implication de Pax7 dans différents aspects du développement embryonnaire de la moelle épinière comme la spécification des progéniteurs neuronaux dans le tube neural dorsal et intermédiaire (Moore et al., 2013; Nakazaki et al., 2008) la différenciation des progéniteurs à l'origine des interneurons intermédiaires de la moelle dorsale (Gard et al., 2017). Cependant à l'âge adulte, à notre connaissance, aucune donnée ne montre l'expression de Pax7 dans la moelle épinière. De même, nos analyses par immunofluorescence n'ont révélé aucune expression de Pax7 quelque soit le niveau de la moelle analysé et nous n'avons détecté aucun évènement de recombinaison dans la moelle de nos souris  $Pax7^{CreERT2}Rosa26-mTmG$ .

Nous avons donc évalué la survie, le poids et les fonctions motrices des souris adultes  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{+/+}$ ,  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/+}$  et  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  en conditions homéostatiques, après les injections de tamoxifène. Globalement, nous n'observons pas de différences statistiquement significatives entre les 3 génotypes de souris en termes de survie et de poids corporel. De même, au stade auquel nous avons évalué la force de préhension et la coordination motrice des souris (3 mois post-TMX), aucune différence n'était observable. Cependant, entre le 5<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> mois post-TMX, 1 souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/+}$  sur 8, et 2 souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  sur 8, ont développé des phénotypes sévères (perte de poids, atrophie musculaire, cyphose et paralysie des membres inférieures) suggérant une atteinte du système neuromusculaire. Nous avons donc choisi de réaliser des analyses plus poussées du système neuromusculaire à ce stade, à savoir 6 mois post-TMX. Nous avons dans un premier temps quantifié le nombre de MN dans les moelles de nos souris par la méthode classique de coloration de Niels. Nous avons dans un premier temps confirmé que le nombre MN était similaire dans les 3 génotypes de souris avant les injections de tamoxifène. En revanche, dans les souris injectées, nous avons mis en évidence une perte significative du nombre de MN au niveau cervical, thoracique et lombaire dans les moelles épinières des souris  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/+}$  et  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  par rapport aux souris contrôles. Nous avons complété ces analyses par une quantification plus précise basée sur les marqueurs ChAT et NeuN, afin de distinguer les MN- $\alpha$  (ChAT+NeuN+) innervant les fibres musculaires, et les MN- $\gamma$  (ChAT+NeuN-) innervant les fibres intrafusales (Friese et al., 2009). Nos résultats démontrent clairement une réduction significative du nombre MN- $\alpha$  dans les moelles  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/+}$  et  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  par rapport aux contrôles, alors que le nombre de MN- $\gamma$  ne varie pas quel que soit le génotype. Ces résultats sont particulièrement intéressants car une étude récente rapporte que les MN- $\alpha$  sont sélectivement touchés dans la moelle des souris SMA sévères, alors que les MN- $\gamma$  ne sont pas affectés (Powis and Gillingwater, 2016). Etonnamment, bien que la déplétion en CS soit plus importante dans les muscles  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/F7}$  (85%) que dans les muscles  $Pax7^{CreERT2/+};Smn^{F7/+}$  (60%), nous n'observons

pas de différence statistiquement significative du nombre de MN- $\alpha$  entre ces 2 groupes de souris. Nous supposons que cela est probablement dû soit à un manque de sensibilité de notre méthode de quantification par immunofluorescence soit à un effet seuil en dessous duquel la perte des MN n'est plus dépendante de la proportion des CS. D'autre part, nos résultats concordent avec ceux obtenus sur le modèle murin *Smn*<sup>+/-</sup> dans lequel la diminution du taux de SMN est de l'ordre de 50% et est accompagnée d'une réduction du nombre de MN mais sans variation significative de la force et ni de la survie des animaux (Balabanian et al., 2007; Jablonka et al., 2000; Udina et al., 2017). A notre connaissance l'haplo-insufisance de *SMN1* n'a pas été décrite chez l'homme, probablement en raison d'une compensation par le gène *SMN2* pouvant être présent en de multiples copies ou de la faible gravité du phénotype en résultant.

Enfin, la question se pose de savoir pourquoi à ce jour, aucune autre étude n'a montré de perte des MN consécutive à une déplétion des CS musculaires (Egner et al., 2016; Fry et al., 2014b, 2015, 2017; Keefe et al., 2015; Liu et al., 2015, 2017; Murach et al., 2017). Plusieurs explications semblent possibles, tout d'abord, la plupart de ces études se sont focalisées sur les effets musculaires de la déplétion en CS et cela sur des périodes inférieures à 6 mois, c'est-à-dire avant le stade auquel nous observons un phénotype sévère, signe d'une atteinte du système neuromusculaire, chez une faible proportion de souris. De plus l'efficacité de déplétion des CS entre les différents modèles pourrait également expliquer ces résultats (Lepper et al., 2009; Mourikis et al., 2011; Murphy et al., 2011).

Comme le type de myosine exprimé par une fibre musculaire est lié au MN qui l'innervent, nous avons analysé la répartition des types de fibres et la taille des fibres dans les TA des souris injectées à 1 mois et 6 mois post-TMX. A 1 mois post-TMX, nous n'observons pas de changements significatifs du typage des fibres, ni de la distribution des aires des fibres. En revanche, 6 mois post-TMX, la taille des fibres est identique entre les 3 génotypes, mais en accord avec la perte des MN, nous observons des changements phénotypiques des fibres musculaires caractéristiques d'un phénomène de dénervation/ré-innervation dans les muscles des souris *Pax7*<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn*<sup>F7/+</sup>, qui deviennent significatifs dans les muscles *Pax7*<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn*<sup>F7/F7</sup> par rapport aux contrôles.

Les études récentes de l'équipe de Chakkalakal J. ont montré que les CS musculaires se trouvent à proximité des JNM, et ont établi l'importance des CS musculaires dans le maintien de l'intégrité des JNM au cours du vieillissement et dans la régénération des JNM après une lésion neuromusculaire (Liu et al., 2015, 2017). Sur la base de ces études, nous supposons que la perte des corps cellulaires des MN que nous observons pourrait être précédée par une atteinte des JNM induite directement ou indirectement via des défauts des fibres musculaires par la déplétion en CS musculaires. La suite de notre étude s'est donc logiquement portée sur l'analyse morphologique des JNM que nous avons réalisée en collaboration avec l'équipe de Laure Stochlic à la Pitié Salpêtrière, 6 mois post-TMX. Ces analyses qualitatives n'ont malheureusement révélé aucun défaut morphologique des JNM présentes dans les muscles *Pax7*<sup>CreERT2/+</sup>;*Smn*<sup>F7/F7</sup> à ce stade. Nous pensons que ces résultats ne remettent pas en question

l'exactitude de notre hypothèse, mais que la perte des MN et par conséquent les atteintes des JNM sont probablement des phénomènes très progressifs et étalés dans le temps, les rendant difficiles à mettre en évidence. Cependant, nous n'excluons pas la possibilité de faire des analyses complémentaires en microscopie électronique pour mieux caractériser les JNM dans notre modèle.

### **Un effort physique modéré induit un phénotype sévère et une réduction de la survie des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* sans affecter les MN**

Afin de déterminer si la faible proportion de souris développant un phénotype sévère était due à un manque de sollicitation du système neuromusculaire chez les souris en conditions homéostatiques, et d'accélérer l'apparition des défauts du système neuromusculaire, nous avons soumis des souris adultes *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* à un effort physique modéré hebdomadaire, 1 mois après les injections de tamoxifène. Pour cela, nous avons ajouté un exercice aérobique (course sur tapis à vitesse très faible) et un exercice isométrique (suspension sur une grille) au protocole de suivi classique des souris (rotarod et grip test), pendant 3 semaines consécutives. Ce protocole a été établi de façon à être en dessous des conditions dans lesquelles le muscle peut être abimé afin d'éviter tout processus de régénération (Chali et al., 2016; Sambasivan et al., 2011).

Dès la deuxième semaine de protocole, les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* ont commencé à perdre du poids et à développer une cyphose qui s'est accentuée au cours de la troisième semaine. Malgré ce phénotype sévère, nous n'avons pas observé d'altération de la coordination motrice avec le test du rotarod, ce qui laisse supposer que les étages supérieurs du SNC et notamment le cervelet, ne sont pas affectés, et qu'il n'y a pas d'atteinte de la myélinisation des axones. Le grip test n'a montré aucune perte de la force de préhension des 4 pattes des souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>*, et l'analyse histologique des TA n'a montré aucune variation significative du phénotype musculaire. Seule une légère atrophie des fibres musculaires des TA, mais restant non significative par rapport aux muscles *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>+/+</sup>*, et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/+</sup>* a été observée. En revanche, nous avons noté qu'immédiatement après l'effort, les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* émettaient des claquements vocaux suggérant une atteinte des muscles respiratoires. Enfin, ni le nombre de MN et ni la morphologie des JNM n'ont pas été affectés par notre protocole d'effort quel que soit le génotype des souris.

Ces expériences confirment que la perte des MN consécutive à la déplétion en CS chez les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;**Smn<sup>F7/F7</sup>* en conditions homéostatiques, est un phénomène progressif qui ne semble pas être dépendant du degré de sollicitation des muscles squelettiques. De plus, nous démontrons que la déplétion du pool de CS induite par déficit en SMN est suffisante pour réduire significativement la survie des souris soumises à un effort physique même très modéré sans atteintes significatives du phénotype des muscles des pattes, et surtout sans atteintes des MN. Au vu des difficultés respiratoires que nous avons observées juste après les tests d'effort, nous supposons que ce phénotype sévère est dû, au moins en partie, à une atteinte des muscles respiratoires, soulignant une nouvelle fois l'importance des CS et des muscles

squelettiques dans la physiopathologie de la SMA. Des analyses plus poussées de la fonction respiratoire de ces souris seront prochainement réalisées pour vérifier cette hypothèse. D'un point de vue plus général, nos observations apportent également des éléments intéressants pour la compréhension de l'importance des CS musculaires au cours d'un effort physique même modéré. En effet, nous observons que la déplétion en CS a un effet délétère à partir d'un certain seuil puisque les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* possédant 40% de leurs CS, ne développent aucun phénotype, alors que les souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* ayant seulement 15% de leurs CS sont très rapidement et sévèrement affectées.

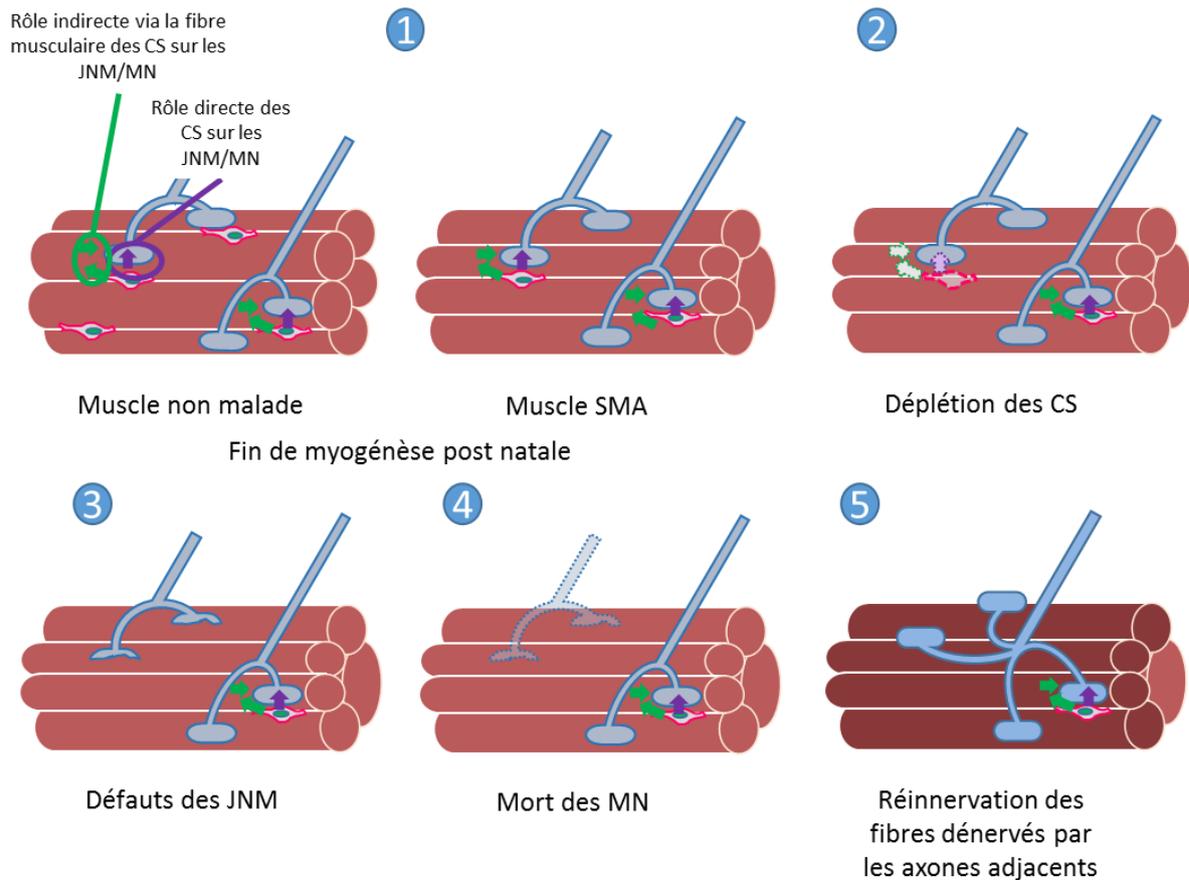
Au total, grâce à notre modèle murin *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*, nous avons démontré que l'ablation, même partielle, de SMN ciblée spécifiquement dans les CS musculaires est suffisante pour induire une perte sélective des MN- $\alpha$  dans la moelle épinière. A notre connaissance, notre étude est la première à démontrer l'influence des CS musculaires sur l'intégrité des MN- $\alpha$ .

Avec cette étude, nous démontrons que les CS musculaires pourraient contribuer à la physiopathologie de la SMA et nous proposons un nouveau mécanisme permettant d'expliquer la dégénérescence sélective des MN- $\alpha$  au cours de la SMA (Mecca et al., en préparation). Par conséquent, ces données soulignent l'importance de cibler les CS musculaires efficacement et très tôt au cours du développement de la pathologie pour préserver l'intégrité du système neuromusculaire sur le long terme, et pourraient donc avoir des implications majeures pour le développement des futures stratégies thérapeutiques. Enfin, ce lien entre les CS musculaires et les MN pourrait aussi avoir des conséquences dans d'autres pathologies neuromusculaires, comme par exemple la sclérose latérale amyotrophique (Pansarasa et al., 2014; Wong and Martin, 2010).

L'ensemble de nos résultats nous conduisent à la proposition du modèle suivant (Fig 29) : (1) Aux stades tardifs de la myogenèse post-natale, le déficit en SMN compromet la constitution du pool de CS quiescentes. (2) Les CS quiescentes déficientes en SMN meurent par apoptose, accentuant la déplétion en CS. (3) La déplétion en CS affecte de manière directe (flèches violettes) ou indirecte (via une atteinte de la fibre musculaire, flèches vertes) l'intégrité des JNM (4) conduisant à une perte sélective des MN- $\alpha$ . (5) Les MN- $\alpha$  restants ré-innervent les fibres dénervées conduisant à des changements phénotypiques des fibres musculaires.

### **Le profil d'expression des miRNA est perturbé dans les CS des souris SMA**

Nos résultats mettent en évidence que les CS musculaires sont des cibles thérapeutiques importantes à considérer pour la préservation du système neuromusculaire à long terme chez les patients SMA. Le troisième objectif de cette thèse a donc été d'étudier les mécanismes moléculaires en aval de SMN dans les CS, et plus particulièrement la voie de biogenèse des miARNs. Le choix de cette voie a été fait pour plusieurs raisons : (1) plusieurs données de la littérature suggèrent de possibles interactions entre SMN et les acteurs impliqués dans la

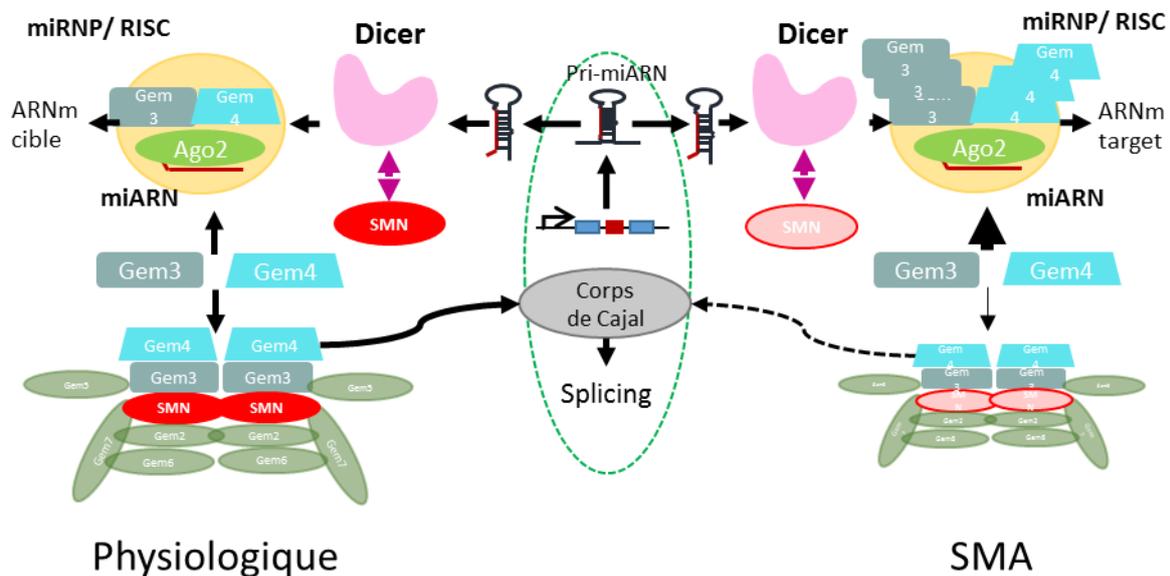


**Figure 29 : Modèle proposé pour le rôle des CS musculaires dans la perte sélective des MN- $\alpha$  au cours de la SMA.**

biogénèse des miARN, (2) une dérégulation de l'expression de certains miARNs a été décrite dans les cellules déficientes en SMN (3) les miARN jouent un rôle prépondérant dans la régulation des CS musculaires, (4) les miARN présentent l'énorme avantage de pouvoir être facilement délivrés *in vivo* soit par l'intermédiaire d'un vecteur AAV, soit par injection directe via un vecteur chimique et enfin (5) les miARN peuvent cibler spécifiquement un ARNm.

Pour cette étude nous avons choisi une approche globale de transcriptomique grâce à une puce Affymétrie permettant la détection de 1908 miARN matures et 1255 pré-miARN. Afin de pouvoir identifier des miARNs d'intérêt pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, nous avons réalisé cette analyse sur des CS purifiées à partir de muscles de souris SMA sévères (hSMN2), 1 jour après la naissance c'est-à-dire à un stade pré-symptomatique. Au total, nous avons identifié 103 séquences dérégulées dans les CS SMA par rapport aux CS contrôles. La majorité de ces séquences correspondent à des miARN matures indiquant que les premières étapes de maturation des miARN ne sont pas spécifiquement affectées par le déficit en SMN dans les CS musculaires. A l'inverse, l'étude récente de Gonçalves et al, a montré une augmentation des formes immatures des miARN associée à une diminution des miARNs matures dans les MN de souris SMA, due à une dégradation accrue de la protéine DROSHA par autophagie (Gonçalves et al., 2018). Par conséquent, les mécanismes

régissant la dérégulation des miARN dans les CS musculaires sont différents de ceux observés dans les MN.



Grâce à une analyse bio-informatique plus poussée de ces données de transcriptomique,

**Figure 30 : Modèle hypothétique de l'impact du déficit en SMN sur la voie des miARN.**

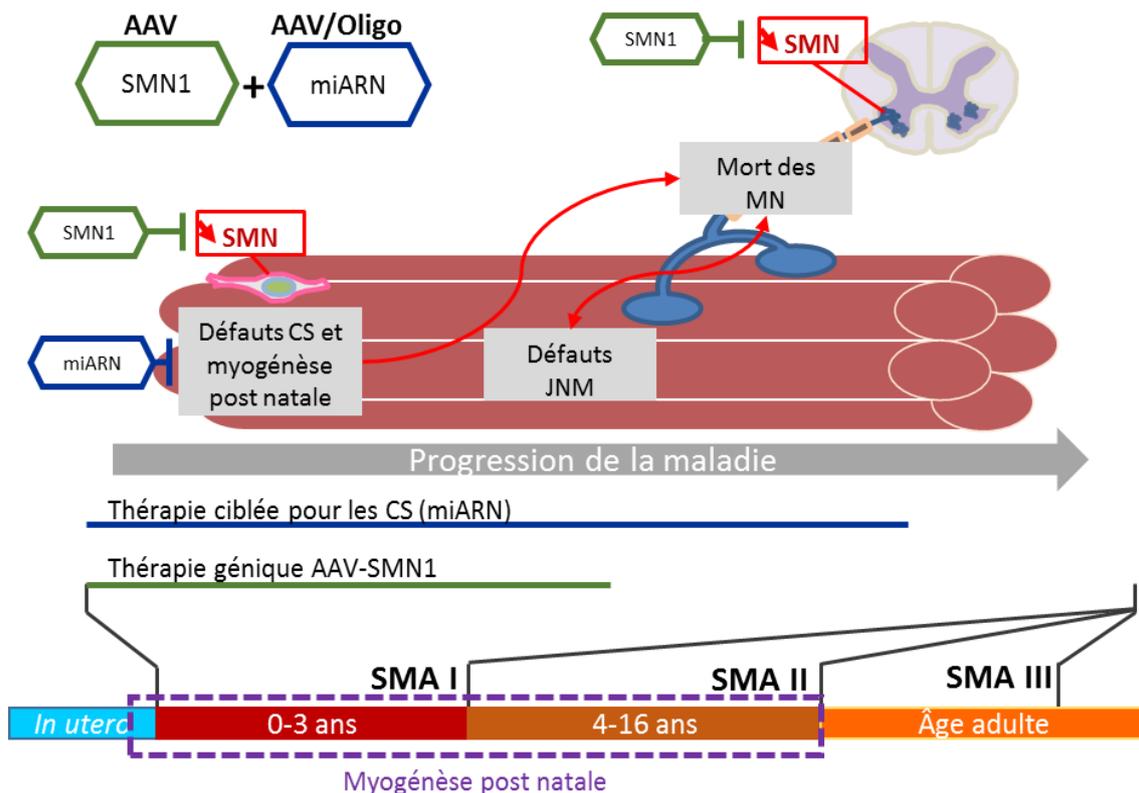
nous avons également constaté que la majorité des miARN dérégulés provenant du brin 3' étaient sous-exprimés. Comme détaillé en introduction, le choix du brin guide est déterminé par plusieurs facteurs dont les protéines composant le complexe protéique pré-RISC. Or, les protéines Gemin3-4 qui font parties de ce complexe pré-RISC, font également partie du complexe SMN. Nous proposons donc qu'un déficit en SMN pourrait indirectement perturber la stœchiométrie du complexe pré-RISC entraînant des perturbations dans le choix du brin guide et conduisant à une diminution du chargement des brins 3' des miARN (Fig 30). En accord avec notre hypothèse, une étude réalisée sur des moelles épinières de souris SMA, a analysé l'expression de 3 miARN régulés par un même promoteur (miR183, 96 et 82). Seul le miR183 mature s'est révélé être surexprimé laissant supposer des défauts lors de la dernière étape de maturation des miARN (Kye et al., 2014). Comme évoqué précédemment, certains miARN sont des acteurs importants de la régulation des CS musculaires et par conséquent leur niveau d'expression varie en fonction de l'état d'activation ou de différenciation de ces cellules. Nous avons donc cherché à déterminer si les modifications du profil d'expression des miARN que nous observons étaient dues aux défauts de comportement des CS musculaires au cours de la myogenèse post-natale, ou étaient la conséquence directe du déficit en SMN. Pour cela, nous avons étudié l'expression de deux myomiR, le miR206 régulant la transition entre la prolifération et la différenciation des CS et le miR489 impliqué dans le maintien de la quiescence, sur des CS purifiées à partir de muscles de notre modèle de KO conditionnel, avant l'induction de l'apoptose. Nous avons observé une augmentation significative du miR206 et une diminution du miR489 dans les CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* déficientes en SMN par rapport aux contrôles, un profil d'expression normalement associé aux CS activées. Cependant, nous

n'avons pas détecté d'induction du marqueur myogénique MyoD, ni du marqueur de prolifération Ki67, indiquant que cette dérégulation des myomiR206 et 489 est directement induite par la perte de SMN et non par un changement d'état des CS. Ces expériences nous fournissent des éléments de preuves supplémentaires quant au rôle direct de SMN dans la voie de biogenèse des miARN.

En parallèle de ces expériences, nous nous sommes intéressés à Dicer1, un autre acteur important de la voie de biogenèse des miARN et plus spécifiquement à sa fonction non canonique d'élimination des dsARN nucléaires récemment décrite (White et al., 2014). En effet, cette étude a démontré que la perte de la localisation nucléaire de Dicer1 induit une accumulation de dsARN et l'apoptose des cellules via la voie de réponse aux interférons (White et al., 2014). Dicer étant capable d'interagir directement avec SMN (Joshi et al., 2013), nous nous sommes demandés si le déficit en SMN pouvait perturber sa localisation cellulaire, et par ce biais induire l'apoptose des CS. Nous avons donc analysé la localisation nucléaire de Dicer1 dans les CS Pax7+ et les autres cellules Pax7- sur des sections de muscles de souris *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>+/+</sup>*, *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>*, quelques heures après la deuxième injection de tamoxifène. Bien que préliminaires, ces analyses nous ont permis de faire plusieurs observations intéressantes. Tout d'abord, dans les muscles de souris contrôles, la grande majorité des CS Pax7+ (~80%) arborent un marquage nucléaire de Dicer1, contrairement aux autres cellules (Pax7-), ce qui suggère que Dicer1 pourrait avoir un rôle spécifique dans le noyau des CS quiescentes du muscle squelettique. D'autre part, nous observons une perte significative de cette localisation nucléaire de Dicer1 dans les CS *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/+</sup>* et *Pax7<sup>CreERT2/+</sup>;Smn<sup>F7/F7</sup>* déficientes en SMN. Ces observations suggèrent donc que SMN pourrait être impliqué dans la localisation cellulaire de Dicer1, et que ce mécanisme pourrait être à l'origine de l'apoptose rapide des CS musculaires en réponse à la perte de SMN. Des expériences complémentaires seront bien entendu nécessaires pour valider notre hypothèse.

### **Identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour la préservation du système neuromusculaire à long terme chez les patients SMA**

L'objectif final de ce projet était d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques des CS musculaires, pouvant être régulées par des miARN. Pour cela, nous avons réalisé une analyse *in silico* des ARNm cibles associés aux miARN dérégulés dans notre analyse transcriptomique. Nous avons identifié 3 ARNm d'intérêt ciblés par au moins 5 miARN sous-exprimés dans les CS SMA : Ago2, impliqué dans la voie de biogenèse des miARN, MEF2A impliqué dans la différenciation des CS et le Récepteur aux Androgènes (RA), impliqué dans la régulation des CS et dans la pathogenèse de l'amyotrophie spino bulbaire (Chen et al., 2005, 2005; Cortes and La Spada, 2018; Liu et al., 2014; Sinha-Hikim et al., 2002, 2004). Nous avons choisi de ne pas retenir Ago2 qui est exprimé dans toutes les cellules, ni MEF2A dont les fonctions sont redondantes avec les autres protéines MEF2 dans le muscle (Liu et al., 2014).



**Figure 31 : Schéma de l'approche thérapeutique proposée pour préserver l'intégrité du système neuromusculaire à long terme chez les patients SMA.**

En revanche, le RA nous semble être une cible thérapeutique intéressante à explorer dans le futur. En effet, dans le muscle le RA est principalement exprimé par les CS et régule leur prolifération et leur différenciation (Sinha-Hikim et al., 2002, 2004). De plus, les mutations sur le gène codant pour le RA ou sa surexpression conduisent à une pathologie proche de la SMA : l'amyotrophie spino bulbaire (Cortes and La Spada, 2018; Monks et al., 2007). Des études complémentaires seront donc réalisées pour valider la dérégulation des miARN d'intérêt et du RA dans les CS de muscles SMA.

En cas de validation du RA comme cible thérapeutique, il sera alors possible d'envisager une thérapie combinée à l'AAV-SMN ou au Nusinersen pour essayer de corriger les défauts de myogénèse post natale dans les CS SMA et ainsi de préserver l'intégrité du système neuromusculaire à long terme. Une des limites majeures de ce type de stratégies sera la modalité de transfert du miARN dans les CS. En effet, nous avons des données démontrant que le vecteur scAAV9 est capable de transduire efficacement les CS dans un muscle post-natal, mais que le fort taux de prolifération de ces cellules à ce stade conduit à une perte totale du transgène 15 jours après l'injection (Didier, Biferi, Mecca et al., en préparation). Une alternative serait donc d'apporter le miARN transporté dans un véhicule (nanoparticule, polymère ou lysosome) de façon régulière tout au long de la myogénèse post natale pour réguler au mieux ce procédé (Fig 31) (Baumann and Winkler, 2014).

En conclusion, l'ensemble des données obtenues au cours de cette thèse apportent une vision nouvelle sur le rôle de SMN dans la régulation des CS musculaires et le rôle des CS musculaires dans la physiopathologie de la SMA. Nous espérons qu'elles pourront contribuer à la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la SMA. De plus, nos résultats apportent de nouveaux éléments pour la compréhension de la relation entre les cellules satellites musculaires et les motoneurones, qui seront applicables à d'autres pathologies neuromusculaires telles que l'ALS.



# Bibliographie



Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738.

Alías, L., Bernal, S., Fuentes-Prior, P., Barceló, M.J., Also, E., Martínez-Hernández, R., Rodríguez-Alvarez, F.J., Martín, Y., Aller, E., Grau, E., et al. (2009). Mutation update of spinal muscular atrophy in Spain: molecular characterization of 745 unrelated patients and identification of four novel mutations in the *SMN1* gene. *Hum. Genet.* 125, 29–39.

Allen, D.L., Roy, R.R., and Edgerton, V.R. (1999). Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22, 1350–1360.

Ando, Y., Tomaru, Y., Morinaga, A., Burroughs, A.M., Kawaji, H., Kubosaki, A., Kimura, R., Tagata, M., Ino, Y., Hirano, H., et al. (2011). Nuclear Pore Complex Protein Mediated Nuclear Localization of Dicer Protein in Human Cells. *PLoS ONE* 6.

Araujo, A. prufer de Q.C., Araujo, M., and Swoboda, K.J. (2009). Vascular Perfusion Abnormalities in Infants with Spinal Muscular Atrophy. *J. Pediatr.* 155, 292–294.

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

Arnold, A.-S., Gueye, M., Guettier-Sigrist, S., Courdier-Fruh, I., Coupin, G., Poindron, P., and Gies, J.-P. (2004). Reduced expression of nicotinic AChRs in myotubes from spinal muscular atrophy I patients. *Lab. Invest.* 84, 1271–1278.

Arnold, W.D., Sheth, K.A., Wier, C.G., Kissel, J.T., Burghes, A.H., and Kolb, S.J. (2015). Electrophysiological Motor Unit Number Estimation (MUNE) Measuring Compound

Muscle Action Potential (CMAP) in Mouse Hindlimb Muscles. *J. Vis. Exp. JoVE*.

Azzouz, M., Le, T., Ralph, G.S., Walmsley, L., Monani, U.R., Lee, D.C.P., Wilkes, F., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., Burghes, A.H.M., et al. (2004). Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.* 114, 1726–1731.

Bach, J.R. (2007). Medical Considerations of Long-Term Survival of Werdnig–Hoffmann Disease. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 86, 349.

Baghdadi, M.B., and Tajbakhsh, S. (2018). Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration. *Dev. Biol.* 433, 200–209.

Balabanian, S., Gendron, N.H., and MacKenzie, A.E. (2007). Histologic and transcriptional assessment of a mild SMA model. *Neurol. Res.* 29, 413–424.

Barkats, M. (2009). Widespread Gene Delivery to Motor Neurons Using Peripheral Injection of Aav Vectors.

Baron-Delage, S., Abadie, A., Echaniz-Laguna, A., Melki, J., and Beretta, L. (2000). Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes. *Mol. Med.* 6, 957–968.

Battle, D.J., Kasim, M., Yong, J., Lotti, F., Lau, C.-K., Mouaikel, J., Zhang, Z., Han, K., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2006). The SMN complex: an assembly machine for RNPs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 313–320.

Baudet, C., Pozas, E., Adameyko, I., Andersson, E., Ericson, J., and Ernfors, P. (2008). Retrograde signaling onto Ret during motor nerve terminal maturation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 963–975.

Baumann, V., and Winkler, J. (2014). miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents. *Future Med. Chem.* 6, 1967–1984.

- Baumbach-Reardon, L., Sacharow, S.J., and Ahearn, M.E. (2012). Spinal Muscular Atrophy, X-Linked Infantile (University of Washington, Seattle).
- Bäumer, D., Lee, S., Nicholson, G., Davies, J.L., Parkinson, N.J., Murray, L.M., Gillingwater, T.H., Ansorge, O., Davies, K.E., and Talbot, K. (2009). Alternative Splicing Events Are a Late Feature of Pathology in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *PLOS Genet.* *5*, e1000773.
- Beck, R., Ravet, M., Wieland, F.T., and Cassel, D. (2009). The COPI system: Molecular mechanisms and function. *FEBS Lett.* *583*, 2701–2709.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* *20*, 1885–1898.
- Bella, V.L., Cisterni, C., Salaün, D., and Pettmann, B. (1998). Survival motor neuron (SMN) protein in rat is expressed as different molecular forms and is developmentally regulated. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 2913–2923.
- Bellamy, L.M., Joannis, S., Grubb, A., Mitchell, C.J., McKay, B.R., Phillips, S.M., Baker, S., and Parise, G. (2014). The acute satellite cell response and skeletal muscle hypertrophy following resistance training. *PloS One* *9*, e109739.
- Bevan, A.K., Hutchinson, K.R., Foust, K.D., Braun, L., McGovern, V.L., Schmelzer, L., Ward, J.G., Petruska, J.C., Lucchesi, P.A., Burghes, A.H.M., et al. (2010). Early heart failure in the SMN $\Delta$ 7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 3895–3905.
- Bloemberg, D., and Quadriatero, J. (2012). Rapid Determination of Myosin Heavy Chain Expression in Rat, Mouse, and Human Skeletal Muscle Using Multicolor Immunofluorescence Analysis. *PLOS ONE* *7*, e35273.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1097–1101.
- Bordet, T., Berna, P., Abitbol, J.-L., Pruss, R.M., Bordet, T., Berna, P., Abitbol, J.-L., and Pruss, R.M. (2010). Olesoxime (TRO19622): A Novel Mitochondrial-Targeted Neuroprotective Compound. *Pharmaceuticals* *3*, 345–368.
- Bottinelli, R., Canepari, M., Reggiani, C., and Stienen, G.J. (1994). Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J. Physiol.* *481*, 663–675.
- Bowerman, M., Shafey, D., and Kothary, R. (2007). Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. *J. Mol. Neurosci.* *MN 32*, 120–131.
- Bowerman, M., Anderson, C.L., Beauvais, A., Boyl, P.P., Witke, W., and Kothary, R. (2009). SMN, profilin IIa and plastin 3: A link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* *42*, 66–74.
- Bowerman, M., Swoboda, K.J., Michalski, J.-P., Wang, G.-S., Reeks, C., Beauvais, A., Murphy, K., Woulfe, J., Sreaton, R.A., Scott, F.W., et al. (2012). Glucose Metabolism and Pancreatic Defects in Spinal Muscular Atrophy. *Ann. Neurol.* *72*, 256–268.
- Boyer, J.G., Deguise, M.-O., Murray, L.M., Yazdani, A., De Repentigny, Y., Boudreau-Larivière, C., and Kothary, R. (2014). Myogenic program dysregulation is contributory to disease pathogenesis in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 4249–4259.
- Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U., and Lührmann, R. (2001). Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSM4, and their interaction with the SMN protein. *RNA N. Y. N* *7*, 1531–1542.
- Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly

recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol. Cell* 44, 120–133.

Braun, J.E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C.-T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M., and Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1324–1331.

Braun, S., Warter, J.M., Poindron, P., Croizat, B., and Lagrange, M.C. (1995). Constitutive muscular abnormalities in culture in spinal muscular atrophy. *The Lancet* 345, 694–695.

Braun, S., Croizat, B., Lagrange, M.-C., Poindron, P., and Warter, J.-M. (1997). Degeneration of cocultures of spinal muscular atrophy muscle cells and rat spinal cord explants is not due to secreted factors and cannot be prevented by neurotrophins. *Muscle Nerve* 20, 953–960.

Bricceno, K.V., Martinez, T., Leikina, E., Duguez, S., Partridge, T.A., Chernomordik, L.V., Fischbeck, K.H., Sumner, C.J., and Burnett, B.G. (2014). Survival motor neuron protein deficiency impairs myotube formation by altering myogenic gene expression and focal adhesion dynamics. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4745–4757.

Bromberg, M.B., and Swoboda, K.J. (2002). Motor Unit Number Estimation in Infants and Children with Spinal Muscular Atrophy. *Muscle Nerve* 25, 445–447.

Bruusgaard, J.C., Johansen, I.B., Egner, I.M., Rana, Z.A., and Gundersen, K. (2010). Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15111–15116.

Burger, K., Schlackow, M., Potts, M., Hester, S., Mohammed, S., and Gullerova, M. (2017). Nuclear phosphorylated Dicer processes double-stranded RNA in response to DNA damage. *J. Cell Biol.* 216, 2373–2389.

Burghes, A.H.M., and Beattie, C.E. (2009). Spinal muscular atrophy: why do low levels of

survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 597–609.

Bürglen, L., Lefebvre, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Cruaud, C., Munnich, A., and Melki, J. (1996a). Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32, 479–482.

Bürglen, L., Amiel, J., Viollet, L., Lefebvre, S., Burlet, P., Clermont, O., Raclin, V., Landrieu, P., Verloes, A., Munnich, A., et al. (1996b). Survival motor neuron gene deletion in the arthrogryposis multiplex congenita-spinal muscular atrophy association. *J. Clin. Invest.* 98, 1130–1132.

Burke, R.E., Strick, P.L., Kanda, K., Kim, C.C., and Walmsley, B. (1977). Anatomy of medial gastrocnemius and soleus motor nuclei in cat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 40, 667–680.

Burkin, D.J., and Kaufman, S.J. (1999). The  $\alpha 7\beta 1$  integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res.* 296, 183–190.

Burlet, P., Huber, C., Bertrand, S., Ludosky, M.A., Zwaenepoel, I., Clermont, O., Roume, J., Delezoide, A.L., Cartaud, J., Munnich, A., et al. (1998). The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1927–1933.

Burnett, B.G., Muñoz, E., Tandon, A., Kwon, D.Y., Sumner, C.J., and Fischbeck, K.H. (2009a). Regulation of SMN Protein Stability. *Mol. Cell Biol.* 29, 1107–1115.

Burnett, B.G., Muñoz, E., Tandon, A., Kwon, D.Y., Sumner, C.J., and Fischbeck, K.H. (2009b). Regulation of SMN Protein Stability. *Mol. Cell Biol.* 29, 1107–1115.

Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J.L., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., and Daub, C.O. (2011). Deep-sequencing of human argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biol.* 8, 158–177.

- Calder, A.N., Androphy, E.J., and Hodgetts, K.J. (2016). Small Molecules in Development for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *J. Med. Chem.* *59*, 10067–10083.
- Cardasis, C.A., and Padykula, H.A. (1981). Ultrastructural evidence indicating reorganization at the neuromuscular junction in the normal rat soleus muscle. *Anat. Rec.* *200*, 41–59.
- Cauchi, R.J. (2010). SMN and Gemins: “we are family” ... or are we?: insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein SMN. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *32*, 1077–1089.
- Chali, F., Deseille, C., Houdebine, L., Benoit, E., Rouquet, T., Bariohay, B., Lopes, P., Branchu, J., Gaspera, B.D., Pariset, C., et al. (2016). Long-term exercise-specific neuroprotection in spinal muscular atrophy-like mice. *J. Physiol.* *594*, 1931–1952.
- Chan, Y.B., Miguel-Aliaga, I., Franks, C., Thomas, N., Trülzsch, B., Sattelle, D.B., Davies, K.E., and van den Heuvel, M. (2003). Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 1367–1376.
- Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* *38*, 228–233.
- Chen, Y., Zajac, J.D., and MacLean, H.E. (2005). Androgen regulation of satellite cell function. *J. Endocrinol.* *186*, 21–31.
- Chen, Y., Gelfond, J., McManus, L.M., and Shireman, P.K. (2011). Temporal microRNA expression during in vitro myogenic progenitor cell proliferation and differentiation: regulation of proliferation by miR-682. *Physiol. Genomics* *43*, 621–630.
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* *447*, 823–828.
- Cheung, T.H., Quach, N.L., Charville, G.W., Liu, L., Park, L., Edalati, A., Yoo, B., Hoang, P., and Rando, T.A. (2012). Maintenance of muscle stem cell quiescence by microRNA-489. *Nature* *482*, 524–528.
- Cho, S., and Dreyfuss, G. (2010). A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev.* *24*, 438–442.
- Christie, M., Boland, A., Huntzinger, E., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2013). Structure of the PAN3 pseudokinase reveals the basis for interactions with the PAN2 deadenylase and the GW182 proteins. *Mol. Cell* *51*, 360–373.
- Chu, C., and Rana, T.M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* *4*, e210.
- Ciciliot, S., Rossi, A.C., Dyar, K.A., Blaauw, B., and Schiaffino, S. (2013). Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 2191–2199.
- Cifuentes-Diaz, C., Frugier, T., Tiziano, F.D., Lacène, E., Roblot, N., Joshi, V., Moreau, M.H., and Melki, J. (2001). Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* *152*, 1107–1114.
- Cifuentes-Diaz, C., Nicole, S., Velasco, M.E., Borra-Cebrian, C., Panozzo, C., Frugier, T., Millet, G., Roblot, N., Joshi, V., and Melki, J. (2002). Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1439–1447.
- Cook, A.L., Curzon, C.L., and Milazzo, A.S. (2006). An infant with hypoplastic left heart syndrome and spinal muscular atrophy. *Cardiol. Young* *16*, 78–80.
- Coover, D.D., Le, T.T., McAndrew, P.E., Strasswimmer, J., Crawford, T.O., Mendell,

- J.R., Coulson, S.E., Androphy, E.J., Prior, T.W., and Burghes, A.H.M. (1997). The Survival Motor Neuron Protein in Spinal Muscular Atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 1205–1214.
- Cortes, C.J., and La Spada, A.R. (2018). X-Linked Spinal and Bulbar Muscular Atrophy: From Clinical Genetic Features and Molecular Pathology to Mechanisms Underlying Disease Toxicity. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1049*, 103–133.
- Courseaux, A., Richard, F., Grosgeorge, J., Ortola, C., Viale, A., Turc-Carel, C., Dutrillaux, B., Gaudray, P., and Nahon, J.-L. (2003). Segmental duplications in euchromatic regions of human chromosome 5: a source of evolutionary instability and transcriptional innovation. *Genome Res.* *13*, 369–381.
- Court, F.A., Gillingwater, T.H., Melrose, S., Sherman, D.L., Greenshields, K.N., Morton, A.J., Harris, J.B., Willison, H.J., and Ribchester, R.R. (2008). Identity, developmental restriction and reactivity of extralaminar cells capping mammalian neuromuscular junctions. *J. Cell Sci.* *121*, 3901–3911.
- Cramer, R.M., Langberg, H., Magnusson, P., Jensen, C.H., Schrøder, H.D., Olesen, J.L., Suetta, C., Teisner, B., and Kjaer, M. (2004). Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. *J. Physiol.* *558*, 333–340.
- Crawford, T.O., and Pardo, C.A. (1996). The Neurobiology of Childhood Spinal Muscular Atrophy. *Neurobiol. Dis.* *3*, 97–110.
- Crawford, T.O., Sladky, J.T., Hurko, O., Besner-Johnston, A., and Kelley, R.I. (1999). Abnormal fatty acid metabolism in childhood spinal muscular atrophy. *Ann. Neurol.* *45*, 337–343.
- Crist, C.G., Montarras, D., and Buckingham, M. (2012). Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell* *11*, 118–126.
- Cuellar, T.L., Davis, T.H., Nelson, P.T., Loeb, G.B., Harfe, B.D., Ullian, E., and McManus, M.T. (2008). Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5614–5619.
- Cullheim, S., Fleshman, J.W., Glenn, L.L., and Burke, R.E. (1987). Membrane area and dendritic structure in type-identified triceps surae alpha motoneurons. *J. Comp. Neurol.* *255*, 68–81.
- Custer, S.K., and Androphy, E.J. (2014). Autophagy dysregulation in cell culture and animals models of spinal muscular atrophy. *Mol. Cell. Neurosci.* *61*, 133–140.
- Custer, S.K., Todd, A.G., Singh, N.N., and Androphy, E.J. (2013). Dilysine motifs in exon 2b of SMN protein mediate binding to the COPI vesicle protein  $\alpha$ -COP and neurite outgrowth in a cell culture model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 4043–4052.
- Dachs, E., Hereu, M., Piedrafita, L., Casanovas, A., Calderó, J., and Esquerda, J.E. (2011). Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *70*, 444–461.
- Dale, H.H., and Dudley, H.W. (1929). The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *J. Physiol.* *68*, 97–123.
- Darr, K.C., and Schultz, E. (1987). Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 *63*, 1816–1821.
- Deguisse, M.-O., De Repentigny, Y., McFall, E., Auclair, N., Sad, S., and Kothary, R. (2017). Immune dysregulation may contribute to disease pathogenesis in spinal muscular atrophy mice. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 801–819.
- Dey, B.K., Gagan, J., and Dutta, A. (2011). miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 203–214.

- Di Leva, G., Garofalo, M., and Croce, C.M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *9*, 287–314.
- Didier, N., Hourdé, C., Amthor, H., Marazzi, G., and Sassoon, D. (2012). Loss of a single allele for Ku80 leads to progenitor dysfunction and accelerated aging in skeletal muscle. *EMBO Mol. Med.* *4*, 910–923.
- DiDonato, C.J., Chen, X.-N., Noya, D., Korenberg, J.R., Nadeau, J.H., and Simard, L.R. (1997). Cloning, Characterization, and Copy Number of the Murine Survival Motor Neuron Gene: Homolog of the Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene. *Genome Res.* *7*, 339–352.
- DiDonato, C.J., Parks, R.J., and Kothary, R. (2003). Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy. *Hum. Gene Ther.* *14*, 179–188.
- Dimitriadi, M., Derdowski, A., Kalloo, G., Maginnis, M.S., O’Hern, P., Bliska, B., Sorkaç, A., Nguyen, K.C.Q., Cook, S.J., Poulgiannis, G., et al. (2016). Decreased function of survival motor neuron protein impairs endocytic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E4377-4386.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 857–902.
- Doktor, T.K., Schröder, L.D., Andersen, H.S., Brøner, S., Kitewska, A., Sørensen, C.B., and Andresen, B.S. (2014). Absence of an intron splicing silencer in porcine *Smn1* intron 7 confers immunity to the exon skipping mutation in human *SMN2*. *PloS One* *9*, e98841.
- Dominguez, E., Marais, T., Chatauret, N., Benkhalifa-Ziyyat, S., Duque, S., Ravassard, P., Carcenac, R., Astord, S., Pereira de Moura, A., Voit, T., et al. (2011). Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized *SMN1* sequence rescues SMA mice. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 681–693.
- Doyle, M., Badertscher, L., Jaskiewicz, L., Güttinger, S., Jurado, S., Hugenschmidt, T., Kutay, U., and Filipowicz, W. (2013). The double-stranded RNA binding domain of human Dicer functions as a nuclear localization signal. *RNA* *19*, 1238–1252.
- Dreyer, H.C., Blanco, C.E., Sattler, F.R., Schroeder, E.T., and Wiswell, R.A. (2006). Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve* *33*, 242–253.
- Dubois, V., Laurent, M.R., Sinnesael, M., Cielen, N., Helsen, C., Clinckemalie, L., Spans, L., Gayan-Ramirez, G., Deldicque, L., Hespel, P., et al. (2014). A satellite cell-specific knockout of the androgen receptor reveals myostatin as a direct androgen target in skeletal muscle. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *28*, 2979–2994.
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.-M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.-A., and Barkats, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *17*, 1187–1196.
- Duque, S.I., Arnold, W.D., Odermatt, P., Li, X., Porensky, P.N., Schmelzer, L., Meyer, K., Kolb, S.J., Schümperli, D., Kaspar, B.K., et al. (2015). A large animal model of Spinal Muscular Atrophy and correction of phenotype. *Ann. Neurol.* *77*, 399–414.
- Echaniz-Laguna, A., Miniou, P., Bartholdi, D., and Melki, J. (1999). The Promoters of the Survival Motor Neuron Gene (*SMN*) and Its Copy (*SMNc*) Share Common Regulatory Elements. *Am. J. Hum. Genet.* *64*, 1365–1370.
- Egner, I.M., Bruusgaard, J.C., and Gundersen, K. (2016). Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. *Development* *143*, 2898–2906.
- Elkohen, M., Vaksman, G., Elkohen, M.R., Francart, C., Foucher, C., and Rey, C. (1996). [Cardiac involvement in Kugelberg-Welander

- disease. A prospective study of 8 cases]. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* *89*, 611–617.
- El-Matary, W., Kotagiri, S., Cameron, D., and Peart, I. (2004). Spinal muscle atrophy type 1 (Werdnig-Hoffman disease) with complex cardiac malformation. *Eur. J. Pediatr.* *163*, 331–332.
- Emde, A., Eitan, C., Liou, L.-L., Libby, R.T., Rivkin, N., Magen, I., Reichenstein, I., Oppenheim, H., Eilam, R., Silvestroni, A., et al. (2015). Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS. *EMBO J.* *34*, 2633–2651.
- d’Errico, P., Boido, M., Piras, A., Valsecchi, V., Amicis, E.D., Locatelli, D., Capra, S., Vagni, F., Vercelli, A., and Battaglia, G. (2013). Selective Vulnerability of Spinal and Cortical Motor Neuron Subpopulations in delta7 SMA Mice. *PLOS ONE* *8*, e82654.
- Fabian, M.R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J.T., Svitkin, Y.V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J.A., et al. (2009). Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol. Cell* *35*, 868–880.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., et al. (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1211–1217.
- Farrar, M.A., Vucic, S., Johnston, H.M., du Sart, D., and Kiernan, M.C. (2013). Pathophysiological Insights Derived by Natural History and Motor Function of Spinal Muscular Atrophy. *J. Pediatr.* *162*, 155–159.
- Farrar, M.A., Park, S.B., Vucic, S., Carey, K.A., Turner, B.J., Gillingwater, T.H., Swoboda, K.J., and Kiernan, M.C. (2017). Emerging therapies and challenges in spinal muscular atrophy. *Ann. Neurol.* *81*, 355–368.
- Fayzullina, S., and Martin, L.J. (2014). Skeletal Muscle DNA Damage Precedes Spinal Motor Neuron DNA Damage in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *PLoS ONE* *9*.
- Feldberg, W., and Vogt, M. (1948). Acetylcholine synthesis in different regions of the central nervous system. *J. Physiol.* *107*, 372–381.
- Felderhoff-Mueser, U., Grohmann, K., Harder, A., Stadelmann, C., Zerres, K., Bühner, C., and Obladen, M. (2002). Severe spinal muscular atrophy variant associated with congenital bone fractures. *J. Child Neurol.* *17*, 718–721.
- Feldkötter, M., Schwarzer, V., Wirth, R., Wienker, T.F., and Wirth, B. (2002). Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 358–368.
- Feng, Z., Ling, K.K.Y., Zhao, X., Zhou, C., Karp, G., Welch, E.M., Naryshkin, N., Ratni, H., Chen, K.S., Metzger, F., et al. (2016). Pharmacologically induced mouse model of adult spinal muscular atrophy to evaluate effectiveness of therapeutics after disease onset. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 964–975.
- Fidziańska, A., and Rafalowska, J. (2002). Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *104*, 363–368.
- Fidziańska, A., Goebel, H.H., and Warlo, I. (1990). ACUTE INFANTILE SPINAL MUSCULAR ATROPHY/MUSCLE APOPTOSIS AS A PROPOSED PATHOGENETIC MECHANISM. *Brain* *113*, 433–445.
- Finkel, R., Bertini, E., Muntoni, F., Mercuri, E., and ENMC SMA Workshop Study Group (2015). 209th ENMC International Workshop: Outcome Measures and Clinical Trial Readiness in Spinal Muscular Atrophy 7-9 November 2014, Heemskerk, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord. NMD* *25*, 593–602.
- Finkel, R.S., McDermott, M.P., Kaufmann, P., Darras, B.T., Chung, W.K., Sproule, D.M., Kang, P.B., Foley, A.R., Yang, M.L., Martens, W.B., et

- al. (2014). Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology* *83*, 810–817.
- Finkel, R.S., Chiriboga, C.A., Vajsar, J., Day, J.W., Montes, J., De Vivo, D.C., Yamashita, M., Rigo, F., Hung, G., Schneider, E., et al. (2016). Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *The Lancet* *388*, 3017–3026.
- Forss-Petter, S., Danielson, P.E., Catsicas, S., Battenberg, E., Price, J., Nerenberg, M., and Sutcliffe, G. (1990). Transgenic mice expressing  $\beta$ -galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron* *5*, 187–197.
- Foust, K.D., Wang, X., McGovern, V.L., Braun, L., Bevan, A.K., Haidet, A.M., Le, T.T., Morales, P.R., Rich, M.M., Burghes, A.H.M., et al. (2010). Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat. Biotechnol.* *28*, 271–274.
- Fox-Walsh, K.L., and Hertel, K.J. (2009). Splice-site pairing is an intrinsically high fidelity process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 1766–1771.
- Friese, A., Kaltschmidt, J.A., Ladle, D.R., Sigrist, M., Jessell, T.M., and Arber, S. (2009). Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor *Err3*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 13588–13593.
- Frugier, T., Tiziano, F.D., Cifuentes-Diaz, C., Miniou, P., Roblot, N., Dierich, A., Meur, M.L., and Melki, J. (2000). Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 849–858.
- Fry, C.S., Lee, J.D., Jackson, J.R., Kirby, T.J., Stasko, S.A., Liu, H., Dupont-Versteegden, E.E., McCarthy, J.J., and Peterson, C.A. (2014a). Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy. *FASEB J.* *28*, 1654–1665.
- Fry, C.S., Noehren, B., Mula, J., Ubele, M.F., Westgate, P.M., Kern, P.A., and Peterson, C.A. (2014b). Fibre type-specific satellite cell response to aerobic training in sedentary adults. *J. Physiol.* *592*, 2625–2635.
- Fry, C.S., Lee, J.D., Mula, J., Kirby, T.J., Jackson, J.R., Liu, F., Yang, L., Mendias, C.L., Dupont-Versteegden, E.E., McCarthy, J.J., et al. (2015). Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat. Med.* *21*, 76–80.
- Fry, C.S., Kirby, T.J., Kosmac, K., McCarthy, J.J., and Peterson, C.A. (2017). Myogenic Progenitor Cells Control Extracellular Matrix Production by Fibroblasts during Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Stem Cell* *20*, 56–69.
- Garcera, A., Bahi, N., Periyakaruppiyah, A., Arumugam, S., and Soler, R.M. (2013). Survival motor neuron protein reduction deregulates autophagy in spinal cord motoneurons in vitro. *Cell Death Dis.* *4*, e686.
- García-Cabezas, M.A., García-Alix, A., Martín, Y., Gutiérrez, M., Hernández, C., Rodríguez, J.I., and Morales, C. (2004). Neonatal spinal muscular atrophy with multiple contractures, bone fractures, respiratory insufficiency and 5q13 deletion. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *107*, 475–478.
- Gard, C., Gonzalez Curto, G., Frarma, Y.E.-M., Chollet, E., Duval, N., Auzié, V., Auradé, F., Vigier, L., Relaix, F., Pierani, A., et al. (2017). Pax3- and Pax7-mediated Dbx1 regulation orchestrates the patterning of intermediate spinal interneurons. *Dev. Biol.* *432*, 24–33.
- Gavrilina, T.O., McGovern, V.L., Workman, E., Crawford, T.O., Gogliotti, R.G., DiDonato, C.J., Monani, U.R., Morris, G.E., and Burghes, A.H.M. (2008). Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1063–1075.
- Gennarelli, M., Lucarelli, M., Capon, F., Pizzuti, A., Merlini, L., Angelini, C., Novelli, G., and

- Dallapiccola, B. (1995). Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *213*, 342–348.
- Germain-Desprez, D., Brun, T., Rochette, C., Semionov, A., Rouget, R., and Simard, L.R. (2001). The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation. *Gene* *279*, 109–117.
- Gibson, M.C., and Schultz, E. (1982). The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat. Rec.* *202*, 329–337.
- Giesemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J.W., Buchmeier, S., Jockusch, B.M., and Jockusch, H. (1999). A Role for Polyproline Motifs in the Spinal Muscular Atrophy Protein SMN PROFILINS BIND TO AND COLOCALIZE WITH SMN IN NUCLEAR GEMS. *J. Biol. Chem.* *274*, 37908–37914.
- Glascock, J.J., Shababi, M., Wetz, M.J., Krogman, M.M., and Lorson, C.L. (2012). Direct central nervous system delivery provides enhanced protection following vector mediated gene replacement in a severe model of Spinal Muscular Atrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *417*, 376–381.
- Gnocchi, V.F., White, R.B., Ono, Y., Ellis, J.A., and Zammit, P.S. (2009). Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells. *PLoS One* *4*, e5205.
- Goljanek-Whysall, K., Sweetman, D., Abu-Elmagd, M., Chapnik, E., Dalmay, T., Hornstein, E., and Münsterberg, A. (2011). MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor Pax3 confers robustness to developmental timing of myogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 11936–11941.
- Gombash, S.E., Cowley, C.J., Fitzgerald, J.A., Iyer, C.C., Fried, D., McGovern, V.L., Williams, K.C., Burghes, A.H.M., Christofi, F.L., Gulbrandsen, B.D., et al. (2015). SMN deficiency disrupts gastrointestinal and enteric nervous system function in mice. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 3847–3860.
- Gonçalves, I. do C.G., Brecht, J., Thelen, M.P., Rehorst, W.A., Peters, M., Lee, H.J., Motameny, S., Torres-Benito, L., Ebrahimi-Fakhari, D., Kononenko, N.L., et al. (2018). Neuronal activity regulates DROSHA via autophagy in spinal muscular atrophy. *Sci. Rep.* *8*, 7907.
- Gordon, T., and de Zepetnek, J.E.T. (2016). Motor unit and muscle fiber type grouping after peripheral nerve injury in the rat. *Exp. Neurol.* *285*, 24–40.
- Gordon, T., Yang, J.F., Ayer, K., Stein, R.B., and Tyreman, N. (1993). Recovery potential of muscle after partial denervation: A comparison between rats and humans. *Brain Res. Bull.* *30*, 477–482.
- Gordon, T., Hegedus, J., and Tam, S.L. (2004). Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease. *Neurol. Res.* *26*, 174–185.
- Gorza, L. (1990). Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* *38*, 257–265.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* *123*, 631–640.
- Grice, S.J., and Liu, J.-L. (2011). Survival Motor Neuron Protein Regulates Stem Cell Division, Proliferation, and Differentiation in *Drosophila*. *PLOS Genet.* *7*, e1002030.
- Grimmler, M., Bauer, L., Nousiainen, M., Körner, R., Meister, G., and Fischer, U. (2005). Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs. *EMBO Rep.* *6*, 70–76.
- Guettier-Sigrist, S., Coupin, G., Braun, S., Warter, J.-M., and Poindron, P. (1998). Muscle

could be the therapeutic target in SMA treatment. *J. Neurosci. Res.* 53, 663–669.

Guettier-Sigrist, S., Coupin, G., Braun, S., Rogovitz, D., Courdier, I., Warter, J.M., and Poindron, P. (2001). On the possible role of muscle in the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 15, 31–40.

Guettier-Sigrist, S., Hugel, B., Coupin, G., Freyssinet, J.-M., Poindron, P., and Warter, J.-M. (2002). Possible pathogenic role of muscle cell dysfunction in motor neuron death in spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 25, 700–708.

van Haelst, U. (1970). An electron microscopic study of muscle in Werdnig-Hoffmann's disease. *Virchows Arch. A* 351, 291–305.

Hall, C.E., Jakus, M.A., and Schmitt, F.O. (1946). An investigation of cross striations and myosin filaments in muscle. *Biol. Bull.* 90, 32–50.

Hamilton, G., and Gillingwater, T.H. (2013). Spinal muscular atrophy: going beyond the motor neuron. *Trends Mol. Med.* 19, 40–50.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* 125, 887–901.

Han, K.-J., Foster, D., Harhaj, E.W., Dzieciatkowska, M., Hansen, K., and Liu, C.-W. (2016). Monoubiquitination of survival motor neuron regulates its cellular localization and Cajal body integrity. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1392–1405.

Han, Y.-S., Geiger, P.C., Cody, M.J., Macken, R.L., and Sieck, G.C. (2003). ATP consumption rate per cross bridge depends on myosin heavy chain isoform. *J. Appl. Physiol.* 94, 2188–2196.

Hao, L.T., Duy, P.Q., Jontes, J.D., Wolman, M., Granato, M., and Beattie, C.E. (2013). Temporal requirement for SMN in motoneuron development. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2612–2625.

Harada, Y., Sutomo, R., Sadewa, A.H., Akutsu, T., Takeshima, Y., Wada, H., Matsuo, M., and Nishio, H. (2002). Correlation between *SMN2* copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three *SMN2* copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J. Neurol.* 249, 1211–1219.

Haramati, S., Chapnik, E., Sztainberg, Y., Eilam, R., Zwang, R., Gershoni, N., McGlenn, E., Heiser, P.W., Wills, A.-M., Wirguin, I., et al. (2010). miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13111–13116.

Harding, A., and Thomas, P. (1980). Hereditary distal spinal muscular atrophy. A report on 34 cases and a review of the literature. *J Neurol Sci* 45, 337–348.

Hayashi, S., and McMahon, A.P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev. Biol.* 244, 305–318.

Hayhurst, M., Wagner, A.K., Cerletti, M., Wagers, A.J., and Rubin, L.L. (2012). A cell-autonomous defect in skeletal muscle satellite cells expressing low levels of survival of motor neuron protein. *Dev. Biol.* 368, 323–334.

He, Z.-H., Bottinelli, R., Pellegrino, M.A., Ferenczi, M.A., and Reggiani, C. (2000). ATP Consumption and Efficiency of Human Single Muscle Fibers with Different Myosin Isoform Composition. *Biophys. J.* 79, 945–961.

Heier, C.R., Satta, R., Lutz, C., and DiDonato, C.J. (2010). Arrhythmia and cardiac defects are a feature of spinal muscular atrophy model mice. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3906–3918.

Hoffmann, J. (1893). Ueber chronische spinale Muskelatrophie in Kindesalter auf familiar Basis. *Dtch Z Nervenheilkd* 3, 427.

Honda, K., Sakaguchi, S., Nakajima, C., Watanabe, A., Yanai, H., Matsumoto, M., Ohteki, T., Kaisho, T., Takaoka, A., Akira, S., et

- al. (2003). Selective contribution of IFN- $\alpha/\beta$  signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 10872–10877.
- Hosseini-barkoobe, S., Peters, M., Torres-Benito, L., Rastetter, R.H., Hupperich, K., Hoffmann, A., Mendoza-Ferreira, N., Kaczmarek, A., Janzen, E., Milbradt, J., et al. (2016). The Power of Human Protective Modifiers: PLS3 and CORO1C Unravel Impaired Endocytosis in Spinal Muscular Atrophy and Rescue SMA Phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* *99*, 647–665.
- Hsieh-Li, H.M., Chang, J.-G., Jong, Y.-J., Wu, M.-H., Wang, N.M., Tsai, C.H., and Li, H. (2000). A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* *24*, 66–70.
- Hu, H.Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Zhou, Y.H., Chen, W., and Khaitovich, P. (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* *10*, 413.
- Hua, Y., Sahashi, K., Rigo, F., Hung, G., Horev, G., Bennett, C.F., and Krainer, A.R. (2011). Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* *478*, 123–126.
- Hua, Y., Liu, Y.H., Sahashi, K., Rigo, F., Bennett, C.F., and Krainer, A.R. (2015). Motor neuron cell-nonautonomous rescue of spinal muscular atrophy phenotypes in mild and severe transgenic mouse models. *Genes Dev.* [gad.256644.114](https://doi.org/10.1101/056644).
- Huang, Z., Chen, X., Yu, B., He, J., and Chen, D. (2012). MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *423*, 265–269.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16961–16966.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 99–110.
- Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T.A., Gibson, G.A., Mctiernan, C.F., Kay, M.A., and Nakai, H. (2006). Robust Systemic Transduction with AAV9 Vectors in Mice: Efficient Global Cardiac Gene Transfer Superior to That of AAV8. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *14*, 45–53.
- Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A., and Wernig, A. (1994). Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev. Dyn.* *199*, 326–337.
- Ishizu, H., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2012). Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes Dev.* *26*, 2361–2373.
- Ito, Y., Kumada, S., Uchiyama, A., Saito, K., Osawa, M., Yagishita, A., Kurata, K., and Hayashi, M. (2004). Thalamic lesions in a long-surviving child with spinal muscular atrophy type I: MRI and EEG findings. *Brain Dev.* *26*, 53–56.
- Iwahashi, H., Eguchi, Y., Yasuhara, N., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., and Tsujimoto, Y. (1997). Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. *Nature* *390*, 413–417.
- Iwakawa, H., and Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol.* *25*, 651–665.
- Jablonka, S., Schrank, B., Kralewski, M., Rossoll, W., and Sendtner, M. (2000). Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 341–346.
- Jablonka, S., Holtmann, B., Meister, G., Bandilla, M., Rossoll, W., Fischer, U., and Sendtner, M. (2002). Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between

- defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneuron cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 10126–10131.
- Jackson, J.R., Kirby, T.J., Fry, C.S., Cooper, R.L., McCarthy, J.J., Peterson, C.A., and Dupont-Versteegden, E.E. (2015). Reduced voluntary running performance is associated with impaired coordination as a result of muscle satellite cell depletion in adult mice. *Skelet. Muscle* *5*, 41.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 113–127.
- Jasmin, B.J., Lee, R.K., and Rotundo, R.L. (1993). Compartmentalization of acetylcholinesterase mRNA and enzyme at the vertebrate neuromuscular junction. *Neuron* *11*, 467–477.
- Jones, R.A., Harrison, C., Eaton, S.L., Llaverro Hurtado, M., Graham, L.C., Alkhamash, L., Oladiran, O.A., Gale, A., Lamont, D.J., Simpson, H., et al. (2017). Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction. *Cell Rep.* *21*, 2348–2356.
- Joshi, P., Greco, T.M., Guise, A.J., Luo, Y., Yu, F., Nesvizhskii, A.I., and Cristea, I.M. (2013). The functional interactome landscape of the human histone deacetylase family. *Mol. Syst. Biol.* *9*, 672.
- Kablar, B., Krastel, K., Tajbakhsh, S., and Rudnicki, M.A. (2003). Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. *Dev. Biol.* *258*, 307–318.
- Kanning, K.C., Kaplan, A., and Henderson, C.E. (2010). Motor neuron diversity in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* *33*, 409–440.
- Karakaya, M., Storbeck, M., Strathmann, E.A., Vedove, A.D., Hölker, I., Altmueller, J., Naghiyeva, L., Schmitz-Steinkrüger, L., Vezyroglou, K., Motameny, S., et al. (2018). Targeted sequencing with expanded gene profile enables high diagnostic yield in non-5q-spinal muscular atrophies. *Hum. Mutat.* *0*.
- Kariya, S., Park, G.-H., Maeno-Hikichi, Y., Leykekhman, O., Lutz, C., Arkovitz, M.S., Landmesser, L.T., and Monani, U.R. (2008). Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 2552–2569.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., and Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:MyoD double-mutant mice. *Nature* *431*, 466–471.
- Kawamata, T., Seitz, H., and Tomari, Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 953–960.
- Kawamata, T., Yoda, M., and Tomari, Y. (2011). Multilayer checkpoints for microRNA authenticity during RISC assembly. *EMBO Rep.* *12*, 944–949.
- Keefe, A.C., Lawson, J.A., Flygare, S.D., Fox, Z.D., Colasanto, M.P., Mathew, S.J., Yandell, M., and Kardon, G. (2015). Muscle stem cells contribute to myofibers in sedentary adult mice. *Nat. Commun.* *6*, 7087.
- Kelly, A.M. (1978). Perisynaptic satellite cells in the developing and mature rat soleus muscle. *Anat. Rec.* *190*, 891–903.
- Kelly, T.E., Amoroso, K., Ferre, M., Blanco, J., Allinson, P., and Prior, T.W. (1999). Spinal muscular atrophy variant with congenital fractures. *Am. J. Med. Genet.* *87*, 65–68.
- Kernell, D. (2003). Principles of force gradation in skeletal muscles. *Neural Plast.* *10*, 69–76.
- Kernell, D., Bakels, R., and Copray, J.C. (1999). Discharge properties of motoneurons: how are they matched to the properties and use of their muscle units? *J. Physiol. Paris* *93*, 87–96.
- Kernochan, L.E., Russo, M.L., Woodling, N.S., Huynh, T.N., Avila, A.M., Fischbeck, K.H., and

- Sumner, C.J. (2005). The role of histone acetylation in SMN gene expression. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 1171–1182.
- Khairallah, M.-T., Astroski, J., Custer, S.K., Androphy, E.J., Franklin, C.L., and Lorson, C.L. (2017). SMN deficiency negatively impacts red pulp macrophages and spleen development in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 932–941.
- Khatri, I.A., Chaudhry, U.S., Seikaly, M.G., Browne, R.H., and Iannaccone, S.T. (2008). Low bone mineral density in spinal muscular atrophy. *J. Clin. Neuromuscul. Dis.* *10*, 11–17.
- Khawaja, K., Houlsby, W.T., Watson, S., Bushby, K., and Cheetham, T. (2004). Hypercalcaemia in infancy; a presenting feature of spinal muscular atrophy. *Arch. Dis. Child.* *89*, 384–385.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 126–139.
- Kirby, T.J., and McCarthy, J.J. (2013). MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation. *Free Radic. Biol. Med.* *64*, 95–105.
- Kirschner, J., Dessaud, E., André, C., Scherrer, B., Pruss, R., Cuvier, V., Hauke, W., Müller-Felber, W., Schara, U., Walter, M., et al. (2014). Results of a Phase II Study to Assess Safety and Efficacy of Olesoxime (TRO19622) in 3- to 25-Year-Old Spinal Muscular Atrophy Patients. *Neuropediatrics* *45*, fp026.
- Kolb, S.J., and Kissel, J.T. (2015). Spinal Muscular Atrophy. *Neurol. Clin.* *33*, 831–846.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 203–229.
- Kong, L., Wang, X., Choe, D.W., Polley, M., Burnett, B.G., Bosch-Marcé, M., Griffin, J.W., Rich, M.M., and Sumner, C.J. (2009). Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 842–851.
- Krol, J., Sobczak, K., Wilczynska, U., Drath, M., Jasinska, A., Kaczynska, D., and Krzyzosiak, W.J. (2004). Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J. Biol. Chem.* *279*, 42230–42239.
- Kummer, T.T., Misgeld, T., and Sanes, J.R. (2006). Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Curr. Opin. Neurobiol.* *16*, 74–82.
- Kwak, P.B., and Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 145–151.
- Kwon, S.C., Nguyen, T.A., Choi, Y.-G., Jo, M.H., Hohng, S., Kim, V.N., and Woo, J.-S. (2016). Structure of Human DROSHA. *Cell* *164*, 81–90.
- Kye, M.J., Niederst, E.D., Wertz, M.H., Gonçalves, I. do C.G., Akten, B., Dover, K.Z., Peters, M., Riessland, M., Neveu, P., Wirth, B., et al. (2014). SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 6318–6331.
- Larsson, L., and Ansved, T. (1995). Effects of ageing on the motor unit. *Prog. Neurobiol.* *45*, 397–458.
- Le, T.T., Coover, D.D., Monani, U.R., Morris, G.E., and Burghes, A.H. (2000). The survival motor neuron (SMN) protein: effect of exon loss and mutation on protein localization. *Neurogenetics* *3*, 7–16.
- Le, T.T., Pham, L.T., Butchbach, M.E.R., Zhang, H.L., Monani, U.R., Coover, D.D., Gavrulina, T.O., Xing, L., Bassell, G.J., and Burghes, A.H.M. (2005). SMN $\Delta$ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 845–857.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-*

4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75, 843–854.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.

Lee, Y. il, Mikesh, M., Smith, I., Rimer, M., and Thompson, W. (2011). Muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy show profound defects in neuromuscular development even in the absence of failure in neuromuscular transmission or loss of motor neurons. *Dev. Biol.* 356, 432–444.

Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., and Zeviani, M. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155–165.

Lepper, C., Conway, S.J., and Fan, C.-M. (2009). Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature* 460, 627–631.

Lepper, C., Partridge, T.A., and Fan, C.-M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* 138, 3639–3646.

Lewelt, A., Krosschell, K.J., Stoddard, G.J., Weng, C., Xue, M., Marcus, R.L., Gappmaier, E., Viollet, L., Johnson, B.A., White, A.T., et al. (2015). Resistance strength training exercise in children with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 52, 559–567.

Li, H., Custer, S.K., Gilson, T., Hao, L.T., Beattie, C.E., and Androphy, E.J. (2015).  $\alpha$ -COP binding to the survival motor neuron protein SMN is required for neuronal process outgrowth. *Hum. Mol. Genet.* 24, 7295–7307.

Ling, K.K.Y., Lin, M.-Y., Zingg, B., Feng, Z., and Ko, C.-P. (2010). Synaptic Defects in the Spinal and Neuromuscular Circuitry in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *PLoS ONE* 5.

Liu, W., and Chakkalakal, J.V. (2018). The Composition, Development, and Regeneration of Neuromuscular Junctions. *Curr. Top. Dev. Biol.* 126, 99–124.

Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441.

Liu, N., Nelson, B.R., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2014). Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4109–4114.

Liu, W., Wei-LaPierre, L., Klose, A., Dirksen, R.T., and Chakkalakal, J.V. (2015). Inducible depletion of adult skeletal muscle stem cells impairs the regeneration of neuromuscular junctions. *ELife* 4.

Liu, W., Klose, A., Forman, S., Paris, N.D., Wei-LaPierre, L., Cortés-Lopéz, M., Tan, A., Flaherty, M., Miura, P., Dirksen, R.T., et al. (2017). Loss of adult skeletal muscle stem cells drives age-related neuromuscular junction degeneration. *ELife* 6.

Lorson, C.L., Strasswimmer, J., Yao, J.M., Baleja, J.D., Hahnen, E., Wirth, B., Le, T., Burghes, A.H., and Androphy, E.J. (1998). SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.* 19, 63–66.

Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J., and Wirth, B. (1999). A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6307–6311.

Lotti, F., Imlach, W.L., Saieva, L., Beck, E.S., Hao, L.T., Li, D.K., Jiao, W., Mentis, G.Z., Beattie, C.E., McCabe, B.D., et al. (2012). An SMN-Dependent U12 Splicing Event Essential for Motor Circuit Function. *Cell* 151, 440–454.

Love, F.M., Son, Y.-J., and Thompson, W.J. (2003). Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the

number of schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J. Neurobiol.* *54*, 566–576.

Luchetti, A., Ciafrè, S.A., Murdocca, M., Malgieri, A., Masotti, A., Sanchez, M., Farace, M.G., Novelli, G., and Sangiuolo, F. (2015). A Perturbed MicroRNA Expression Pattern Characterizes Embryonic Neural Stem Cells Derived from a Severe Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 18312–18327.

Lutz, C.M., Kariya, S., Patruni, S., Osborne, M.A., Liu, D., Henderson, C.E., Li, D.K., Pellizzoni, L., Rojas, J., Valenzuela, D.M., et al. (2011). Postsymptomatic restoration of SMN rescues the disease phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.* *121*, 3029–3041.

Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 9667–9672.

Mackey, A.L., Kjaer, M., Charifi, N., Henriksson, J., Bojsen-Moller, J., Holm, L., and Kadi, F. (2009). Assessment of satellite cell number and activity status in human skeletal muscle biopsies. *Muscle Nerve* *40*, 455–465.

MacRae, I.J., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2007). Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 934–940.

Madsen, K.L., Hansen, R.S., Preisler, N., Thøgersen, F., Berthelsen, M.P., and Vissing, J. (2015). Training improves oxidative capacity, but not function, in spinal muscular atrophy type III. *Muscle Nerve* *52*, 240–244.

Mannaa, M.M., Kalra, M., Wong, B., Cohen, A.P., and Amin, R.S. (2009). Survival Probabilities of Patients With Childhood Spinal Muscle Atrophy. *J. Clin. Neuromuscul. Dis.* *10*, 85.

Martí, E., Pantano, L., Bañez-Coronel, M., Llorens, F., Miñones-Moyano, E., Porta, S., Sumoy, L., Ferrer, I., and Estivill, X. (2010). A

myriad of miRNA variants in control and Huntington's disease brain regions detected by massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res.* *38*, 7219–7235.

Martineau, É., Di Polo, A., Vande Velde, C., and Robitaille, R. (2018). Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS. *ELife* *7*, e41973.

Martinez, T.L., Kong, L., Wang, X., Osborne, M.A., Crowder, M.E., Van Meerbeke, J.P., Xu, X., Davis, C., Wooley, J., Goldhamer, D.J., et al. (2012). Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 8703–8715.

Martínez-Hernández, R., Soler-Botija, C., Also, E., Alias, L., Caselles, L., Gich, I., Bernal, S., and Tizzano, E.F. (2009). The Developmental Pattern of Myotubes in Spinal Muscular Atrophy Indicates Prenatal Delay of Muscle Maturation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *68*, 474–481.

Martínez-Hernández, R., Bernal, S., Alias, L., and Tizzano, E.F. (2014). Abnormalities in Early Markers of Muscle Involvement Support a Delay in Myogenesis in Spinal Muscular Atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *73*, 559–567.

Mauro, A. (1961). SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *9*, 493–495.

Mayeuf-Louchart, A., Hardy, D., Thorel, Q., Roux, P., Gueniot, L., Briand, D., Mazeraud, A., Bouglé, A., Shorte, S.L., Staels, B., et al. (2018). MuscleJ: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool. *Skelet. Muscle* *8*, 25.

McCarthy, J.J., Mula, J., Miyazaki, M., Erfani, R., Garrison, K., Farooqui, A.B., Srikuea, R., Lawson, B.A., Grimes, B., Keller, C., et al. (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development* *138*, 3657–3666.

- McGovern, J.V., Patitucci, T.N., Nord, J.A., Barabas, M.-E.A., Stucky, C.L., and Ebert, A.D. (2013). Spinal muscular atrophy astrocytes exhibit abnormal calcium regulation and reduced growth factor production. *Glia* *61*, 1418–1428.
- Meijer, H.A., Smith, E.M., and Bushell, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem. Soc. Trans.* *42*, 1135–1140.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 447–459.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* *15*, 185–197.
- Melki, J., Sheth, P., Abdelhak, S., Burlet, P., Bachelot, M.F., Frézal, J., Munnich, A., and Lathrop, M.G. (1990). Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. *The Lancet* *336*, 271–273.
- Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., et al. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* *377*, 1713–1722.
- Menke, L.A., Poll-The, B.T., Clur, S.-A., Bilardo, C.M., van der Wal, A.C., Lemmink, H.H., and Cobben, J.M. (2008). Congenital heart defects in spinal muscular atrophy type I: a clinical report of two siblings and a review of the literature. *Am. J. Med. Genet. A.* *146A*, 740–744.
- Mentis, G.Z., Blivis, D., Liu, W., Drobac, E., Crowder, M.E., Kong, L., Alvarez, F.J., Sumner, C.J., and O'Donovan, M.J. (2011). Early Functional Impairment of Sensory-Motor Connectivity in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *Neuron* *69*, 453–467.
- Mercuri, E., Finkel, R.S., Muntoni, F., Wirth, B., Montes, J., Main, M., Mazzone, E.S., Vitale, M., Snyder, B., Quijano-Roy, S., et al. (2018). Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscul. Disord.* *28*, 103–115.
- Merlie, J.P., and Sanes, J.R. (1985). Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibres. *Nature* *317*, 66–68.
- Messéant, J., Dobbertin, A., Girard, E., Delers, P., Manuel, M., Mangione, F., Schmitt, A., Denmat, D.L., Molgó, J., Zytnicki, D., et al. (2015). MuSK Frizzled-Like Domain Is Critical for Mammalian Neuromuscular Junction Formation and Maintenance. *J. Neurosci.* *35*, 4926–4941.
- Meyer, K., Ferraiuolo, L., Schmelzer, L., Braun, L., McGovern, V., Likhite, S., Michels, O., Govoni, A., Fitzgerald, J., Morales, P., et al. (2015). Improving Single Injection CSF Delivery of AAV9-mediated Gene Therapy for SMA: A Dose–response Study in Mice and Nonhuman Primates. *Mol. Ther.* *23*, 477–487.
- Michaelidis, T.M., Sendtner, M., Cooper, J.D., Airaksinen, M.S., Holtmann, B., Meyer, M., and Thoenen, H. (1996). Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development. *Neuron* *17*, 75–89.
- Michaud, M., Arnoux, T., Bielli, S., Durand, E., Rotrou, Y., Jablonka, S., Robert, F., Giraudon-Paoli, M., Riessland, M., Mattei, M.-G., et al. (2010). Neuromuscular defects and breathing disorders in a new mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* *38*, 125–135.
- Miguel-Aliaga, I., Culetto, E., Walker, D.S., Baylis, H.A., Sattelle, D.B., and Davies, K.E. (1999). The Caenorhabditis Elegans Orthologue of the Human Gene Responsible for Spinal Muscular Atrophy Is a Maternal Product Critical for Germline Maturation and Embryonic Viability. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 2133–2143.

- Miledi, R., and Slater, C.R. (1970). On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *J. Physiol.* *207*, 507–528.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* *80*, 293–299.
- Modzelewski, A.J., Holmes, R.J., Hilz, S., Grimson, A., and Cohen, P.E. (2012). AGO4 regulates entry into meiosis and influences silencing of sex chromosomes in the male mouse germline. *Dev. Cell* *23*, 251–264.
- Mohaghegh, P., Rodrigues, N.R., Owen, N., Ponting, C.P., Le, T.T., Burghes, A.H., and Davies, K.E. (1999). Analysis of mutations in the tudor domain of the survival motor neuron protein SMN. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *7*, 519–525.
- Møller, P., Moe, N., Saugstad, O.D., Skullerud, K., Velken, M., Berg, K., Nitter-Hauge, S., and Børresen, A.-L. (1990). Spinal muscular atrophy type I combined with atrial septal defect in three sibs. *Clin. Genet.* *38*, 81–83.
- Monani, U.R. (2005). Spinal Muscular Atrophy: A Deficiency in a Ubiquitous Protein; a Motor Neuron-Specific Disease. *Neuron* *48*, 885–895.
- Monani, U.R., Sendtner, M., Covert, D.D., Parsons, D.W., Andreassi, C., Le, T.T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossoll, W., Rossol, W., et al. (2000). The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 333–339.
- Monani, U.R., Pastore, M.T., Gavriliina, T.O., Jablonka, S., Le, T.T., Andreassi, C., DiCocco, J.M., Lorson, C., Androphy, E.J., Sendtner, M., et al. (2003). A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. *J. Cell Biol.* *160*, 41–52.
- Monks, D.A., Johansen, J.A., Mo, K., Rao, P., Eagleson, B., Yu, Z., Lieberman, A.P., Breedlove, S.M., and Jordan, C.L. (2007). Overexpression of wild-type androgen receptor in muscle recapitulates polyglutamine disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 18259–18264.
- Moore, S., Ribes, V., Terriente, J., Wilkinson, D., Relaix, F., and Briscoe, J. (2013). Distinct Regulatory Mechanisms Act to Establish and Maintain Pax3 Expression in the Developing Neural Tube. *PLOS Genet.* *9*, e1003811.
- Morency, E., Sabra, M., Catez, F., Texier, P., and Lomonte, P. (2007). A novel cell response triggered by interphase centromere structural instability. *J Cell Biol* *177*, 757–768.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* *16*, 720–728.
- Mourikis, P., Sambasivan, R., Castel, D., Rocheteau, P., Bizzarro, V., and Tajbakhsh, S. (2011). A Critical Requirement for Notch Signaling in Maintenance of the Quiescent Skeletal Muscle Stem Cell State. *STEM CELLS* *30*, 243–252.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., and Smith, A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* *116*, 201–211.
- Mulleners, W.M., van Ravenswaay, C.M., Gabreëls, F.J., Hamel, B.C., van Oort, A., and Sengers, R.C. (1996). Spinal muscular atrophy combined with congenital heart disease: a report of two cases. *Neuropediatrics* *27*, 333–334.
- Munsat, T.L., and Davies, K.E. (1992). International SMA consortium meeting. (26–28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul. Disord. NMD* *2*, 423–428.
- Munsat, T.L., Skerry, L., Korf, B., Pober, B., Schapira, Y., Gascon, G.G., Al-Rajeh, S.M., Dubowitz, V., Davies, K., Brzustowicz, L.M., et al. (1990). Phenotypic heterogeneity of spinal muscular atrophy mapping to chromosome

5q11.2-13.3 (SMA 5q). *Neurology* 40, 1831–1831.

Muqit, M.M.K., Moss, J., Sewry, C., and Lane, R.J.M. (2004). Phenotypic variability in siblings with type III spinal muscular atrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 1762–1764.

Murach, K.A., Confides, A.L., Ho, A., Jackson, J.R., Ghazala, L.S., Peterson, C.A., and Dupont-Versteegden, E.E. (2017). Depletion of Pax7+ satellite cells does not affect diaphragm adaptations to running in young or aged mice. *J. Physiol.* 595, 6299–6311.

Murach, K.A., Fry, C.S., Kirby, T.J., Jackson, J.R., Lee, J.D., White, S.H., Dupont-Versteegden, E.E., McCarthy, J.J., and Peterson, C.A. (2018). Starring or Supporting Role? Satellite Cells and Skeletal Muscle Fiber Size Regulation. *Physiol. Bethesda Md* 33, 26–38.

Murdocca, M., Ciafrè, S.A., Spitalieri, P., Talarico, R.V., Sanchez, M., Novelli, G., and Sangiuolo, F. (2016). SMA Human iPSC-Derived Motor Neurons Show Perturbed Differentiation and Reduced miR-335-5p Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

Murphy, M.M., Lawson, J.A., Mathew, S.J., Hutcheson, D.A., and Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Dev. Camb. Engl.* 138, 3625–3637.

Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593–605.

Nakazaki, H., Reddy, A.C., Mania-Farnell, B.L., Shen, Y.-W., Ichi, S., McCabe, C., George, D., McLone, D.G., Tomita, T., and Mayanil, C.S.K. (2008). Key basic helix-loop-helix transcription factor genes *Hes1* and *Ngn2* are regulated by *Pax3* during mouse embryonic development. *Dev. Biol.* 316, 510–523.

Naryshkin, N.A., Weetall, M., Dakka, A., Narasimhan, J., Zhao, X., Feng, Z., Ling, K.K.Y., Karp, G.M., Qi, H., Woll, M.G., et al. (2014). SMN2 splicing modifiers improve motor

function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science* 345, 688–693.

Nguyen, T.A., Jo, M.H., Choi, Y.-G., Park, J., Kwon, S.C., Hohng, S., Kim, V.N., and Woo, J.-S. (2015). Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* 161, 1374–1387.

Nicole, S., Diaz, C.C., Frugier, T., and Melki, J. (2002). Spinal muscular atrophy: Recent advances and future prospects. *Muscle Nerve* 26, 4–13.

Nicole, S., Desforges, B., Millet, G., Lesbordes, J., Cifuentes-Diaz, C., Vertes, D., Cao, M.L., De Backer, F., Languille, L., Roblot, N., et al. (2003). Intact satellite cells lead to remarkable protection against *Smn* gene defect in differentiated skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 161, 571–582.

Noland, C.L., and Doudna, J.A. (2013). Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA* 19, 639–648.

Nölle, A., Zeug, A., van Bergeijk, J., Tönges, L., Gerhard, R., Brinkmann, H., Al Rayes, S., Hensel, N., Schill, Y., Apkhazava, D., et al. (2011). The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the rho-kinase pathway via profilin. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4865–4878.

Novelli, G., Calzà, L., Amicucci, P., Giardino, L., Pozza, M., Silani, V., Pizzuti, A., Gennarelli, M., Piombo, G., Capon, F., et al. (1997). Expression Study of Survival Motor Neuron Gene in Human Fetal Tissues. *Biochem. Mol. Med.* 61, 102–106.

Ogino, S., Leonard, D.G.B., Rennert, H., Ewens, W.J., and Wilson, R.B. (2002). Genetic risk assessment in carrier testing for spinal muscular atrophy. *Am. J. Med. Genet.* 110, 301–307.

Ohanian, M., Humphreys, D.T., Anderson, E., Preiss, T., and Fatkin, D. (2013). A heterozygous variant in the human cardiac miR-133 gene, MIR133A2, alters miRNA duplex processing and strand abundance. *BMC Genet.* 14, 18.

- Ohkawa, Y., Marfella, C.G.A., and Imbalzano, A.N. (2006). Skeletal muscle specification by myogenin and Mef2D via the SWI/SNF ATPase Brg1. *EMBO J.* *25*, 490–501.
- Olguin, H.C., and Olwin, B.B. (2004). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev. Biol.* *275*, 375–388.
- Omar, A., and Bhimji, S.S. (2018). *Physiology, Neuromuscular Junction*. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Oprea, G.E., Kröber, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Müller, S., Krawczak, M., Bassell, G.J., Beattie, C.E., and Wirth, B. (2008). Platin 3 Is a Protective Modifier of Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy. *Science* *320*, 524–527.
- Osborne, M., Gomez, D., Feng, Z., McEwen, C., Beltran, J., Cirillo, K., El-Khodori, B., Lin, M.-Y., Li, Y., Knowlton, W.M., et al. (2012). Characterization of behavioral and neuromuscular junction phenotypes in a novel allelic series of SMA mouse models. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 4431–4447.
- Ottesen, E.W., Howell, M.D., Singh, N.N., Seo, J., Whitley, E.M., and Singh, R.N. (2016). Severe impairment of male reproductive organ development in a low SMN expressing mouse model of spinal muscular atrophy. *Sci. Rep.* *6*, 20193.
- Paez-Colasante, X., Seaberg, B., Martinez, T.L., Kong, L., Sumner, C.J., and Rimer, M. (2013). Improvement of neuromuscular synaptic phenotypes without enhanced survival and motor function in severe spinal muscular atrophy mice selectively rescued in motor neurons. *PLoS One* *8*, e75866.
- Palacino, J., Swalley, S.E., Song, C., Cheung, A.K., Shu, L., Zhang, X., Hoosear, M.V., Shin, Y., Chin, D.N., Keller, C.G., et al. (2015). SMN2 splice modulators enhance U1–pre-mRNA association and rescue SMA mice. *Nat. Chem. Biol.* *11*, 511–517.
- Pansarasa, O., Rossi, D., Berardinelli, A., and Cereda, C. (2014). Amyotrophic Lateral Sclerosis and Skeletal Muscle: An Update. *Mol. Neurobiol.* *49*, 984–990.
- Park, G.-H., Maeno-Hikichi, Y., Awano, T., Landmesser, L.T., and Monani, U.R. (2010). Reduced Survival of Motor Neuron (SMN) Protein in Motor Neuronal Progenitors Functions Cell Autonomously to Cause Spinal Muscular Atrophy in Model Mice Expressing the Human Centromeric (SMN2) Gene. *J. Neurosci.* *30*, 12005–12019.
- Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain–siRNA guide complex. *Nature* *434*, 663–666.
- Parsons, D.W., McAndrew, P.E., Iannaccone, S.T., Mendell, J.R., Burghes, A.H., and Prior, T.W. (1998). Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *Am. J. Hum. Genet.* *63*, 1712–1723.
- Passini, M.A., Bu, J., Richards, A.M., Treleaven, C.M., Sullivan, J.A., O’Riordan, C.R., Scaria, A., Kells, A.P., Samaranch, L., San Sebastian, W., et al. (2014). Translational fidelity of intrathecal delivery of self-complementary AAV9-survival motor neuron 1 for spinal muscular atrophy. *Hum. Gene Ther.* *25*, 619–630.
- Peeters, K., Chamova, T., and Jordanova, A. (2014). Clinical and genetic diversity of SMN1-negative proximal spinal muscular atrophies. *Brain* *137*, 2879–2896.
- Pelkmans, L., and Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic Cph. Den.* *3*, 311–320.
- Periyakaruppiyah, A., de la Fuente, S., Arumugam, S., Bahí, N., Garcera, A., and Soler, R.M. (2016). Autophagy modulators regulate survival motor neuron protein stability in motoneurons. *Exp. Neurol.* *283*, 287–297.
- Peter, C.J., Evans, M., Thayanithy, V., Taniguchi-Ishigaki, N., Bach, I., Kolpak, A.,

- Bassell, G.J., Rossoll, W., Lorson, C.L., Bao, Z.-Z., et al. (2011). The COPI vesicle complex binds and moves with survival motor neuron within axons. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1701–1711.
- Petri, S., Dueck, A., Lehmann, G., Putz, N., Rüdell, S., Kremmer, E., and Meister, G. (2011). Increased siRNA duplex stability correlates with reduced off-target and elevated on-target effects. *RNA* *17*, 737–749.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* *309*, 1573–1576.
- Powell, J.A., Molgó, J., Adams, D.S., Colasante, C., Williams, A., Bohlen, M., and Jaimovich, E. (2003). IP3 Receptors and Associated Ca<sup>2+</sup> Signals Localize to Satellite Cells and to Components of the Neuromuscular Junction in Skeletal Muscle. *J. Neurosci.* *23*, 8185–8192.
- Powis, R.A., and Gillingwater, T.H. (2016). Selective loss of alpha motor neurons with sparing of gamma motor neurons and spinal cord cholinergic neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Anat.* *228*, 443–451.
- Powis, R.A., Karyka, E., Boyd, P., Côme, J., Jones, R.A., Zheng, Y., Szunyogova, E., Groen, E.J.N., Hunter, G., Thomson, D., et al. (2016). Systemic restoration of UBA1 ameliorates disease in spinal muscular atrophy. *JCI Insight* *1*, e87908.
- Qiu, L., Tan, E.K., and Zeng, L. (2015). microRNAs and Neurodegenerative Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* *888*, 85–105.
- Raffaello, A., Laveder, P., Romualdi, C., Bean, C., Toniolo, L., Germinario, E., Megighian, A., Danieli-Betto, D., Reggiani, C., and Lanfranchi, G. (2006). Denervation in murine fast-twitch muscle: short-term physiological changes and temporal expression profiling. *Physiol. Genomics* *25*, 60–74.
- Rajasethupathy, P., Antonov, I., Sheridan, R., Frey, S., Sander, C., Tuschl, T., and Kandel, E.R. (2012). A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell* *149*, 693–707.
- Rajendra, T.K., Gonsalvez, G.B., Walker, M.P., Shpargel, K.B., Salz, H.K., and Matera, A.G. (2007). A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J. Cell Biol.* *176*, 831–841.
- Rao, P.K., Kumar, R.M., Farkhondeh, M., Baskerville, S., and Lodish, H.F. (2006). Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 8721–8726.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* *435*, 948–953.
- Rindt, H., Feng, Z., Mazzasette, C., Glascock, J.J., Valdivia, D., Pyles, N., Crawford, T.O., Swoboda, K.J., Patitucci, T.N., Ebert, A.D., et al. (2015). Astrocytes influence the severity of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 4094–4102.
- Robertson, W.C., Kawamura, Y., and Dyck, P.J. (1978). Morphometric study of motoneurons in congenital nemaline myopathy and Werdnig-Hoffmann disease. *Neurology* *28*, 1057–1061.
- Rochette, C., Gilbert, N., and Simard, L. (2001). *SMN* gene duplication and the emergence of the *SMN2* gene occurred in distinct hominids: *SMN2* is unique to *Homo sapiens*. *Hum. Genet.* *108*, 255–266.
- Rodrigues, N.R., Owen, N., Talbot, K., Ignatius, J., Dubowitz, V., and Davies, K.E. (1995). Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 631–634.

- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* *14*, 1902–1910.
- Roos, M., Sarkozy, A., Chierchia, G.B., Wilde, P.D., Schmedding, E., and Brugada, P. (2009). Malignant Ventricular Arrhythmia in a Case of Adult Onset of Spinal Muscular Atrophy (Kugelberg–Welander Disease). *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *20*, 342–344.
- Rossoll, W., Kröning, A.-K., Ohndorf, U.-M., Steegborn, C., Jablonka, S., and Sendtner, M. (2002). Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum. Mol. Genet.* *11*, 93–105.
- Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kröning, A.-K., Karle, K., Monani, U.R., and Sendtner, M. (2003). Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell Biol.* *163*, 801–812.
- Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean, M., Shutter, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., et al. (1995). The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* *80*, 167–178.
- Roy, S., Dubowitz, V., and Wolman, L. (1971). Ultrastructure of muscle in infantile spinal muscular atrophy. *J. Neurol. Sci.* *12*, 219–232.
- Rudnik-Schöneborn, S., Goebel, H.H., Schlote, W., Molaian, S., Omran, H., Ketelsen, U., Korinthenberg, R., Wenzel, D., Lauffer, H., Kreiss-Nachtsheim, M., et al. (2003). Classical infantile spinal muscular atrophy with SMN deficiency causes sensory neuronopathy. *Neurology* *60*, 983–987.
- Rudnik-Schöneborn, S., Vogelgesang, S., Armbrust, S., Graul-Neumann, L., Fusch, C., and Zerres, K. (2010). Digital necroses and vascular thrombosis in severe spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* *42*, 144–147.
- Sabra, M., Texier, P., El Maalouf, J., and Lomonte, P. (2013). The Tudor protein survival motor neuron (SMN) is a chromatin-binding protein that interacts with methylated lysine 79 of histone H3. *J. Cell Sci.* *126*, 3664–3677.
- Saito, Y. (1985). Muscle fibre type differentiation and satellite cell population in Werdnig-Hoffmann disease. *J. Neurol. Sci.* *68*, 75–87.
- Samaranch, L., Salegio, E.A., San Sebastian, W., Kells, A.P., Foust, K.D., Bringas, J.R., Lamarre, C., Forsayeth, J., Kaspar, B.K., and Bankiewicz, K.S. (2011). Adeno-Associated Virus Serotype 9 Transduction in the Central Nervous System of Nonhuman Primates. *Hum. Gene Ther.* *23*, 382–389.
- Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpfennig, A., Wittenberghe, L.V., Paldi, A., Gayraud-Morel, B., Guenou, H., Malissen, B., Tajbakhsh, S., and Galy, A. (2011). Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* *138*, 3647–3656.
- Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 791–805.
- Sato, K., Eguchi, Y., Kodama, T.S., and Tsujimoto, Y. (2000). Regions essential for the interaction between Bcl-2 and SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product. *Cell Death Differ.* *7*, 374–383.
- Schaeffer, L., de Kerchove d’Exaerde, A., and Changeux, J.P. (2001). Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron* *31*, 15–22.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol. Rev.* *91*, 1447–1531.
- Schrank, B., Götz, R., Gunnensen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K.V., Smith, A.G., and Sendtner, M. (1997). Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human

- spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 9920–9925.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199–208.
- Scoto, M., Finkel, R.S., Mercuri, E., and Muntoni, F. (2017). Therapeutic approaches for spinal muscular atrophy (SMA). *Gene Ther.* *24*, 514–519.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* *102*, 777–786.
- See, K., Yadav, P., Giegerich, M., Cheong, P.S., Graf, M., Vyas, H., Lee, S.G.P., Mathavan, S., Fischer, U., Sendtner, M., et al. (2014). SMN deficiency alters Nrnx2 expression and splicing in zebrafish and mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 1754–1770.
- Seng, C.O., Magee, C., Young, P.J., Lorson, C.L., and Allen, J.P. (2015). The SMN structure reveals its crucial role in snRNP assembly. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 2138–2146.
- Seng, C.O., Magee, C., Young, P.J., Lorson, C.L., and Allen, J.P. (2016). Retraction notice: the SMN structure reveals its crucial role in snRNP assembly. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 5516–5516.
- Seo, J., Singh, N.N., Ottesen, E.W., Lee, B.M., and Singh, R.N. (2016). A novel human-specific splice isoform alters the critical C-terminus of Survival Motor Neuron protein. *Sci. Rep.* *6*.
- Setola, V., Terao, M., Locatelli, D., Bassanini, S., Garattini, E., and Battaglia, G. (2007). Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1959–1964.
- Shababi, M., Habibi, J., Yang, H.T., Vale, S.M., Sewell, W.A., and Lorson, C.L. (2010). Cardiac defects contribute to the pathology of spinal muscular atrophy models. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 4059–4071.
- Shabalina, S.A., and Koonin, E.V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol. Evol.* *23*, 578–587.
- Shafey, D., Côté, P.D., and Kothary, R. (2005). Hypomorphic Smn knockdown C2C12 myoblasts reveal intrinsic defects in myoblast fusion and myotube morphology. *Exp. Cell Res.* *311*, 49–61.
- Shanmugarajan, S., Swoboda, K.J., Iannaccone, S.T., Ries, W.L., Maria, B.L., and Reddy, S.V. (2007). Congenital bone fractures in spinal muscular atrophy: functional role for SMN protein in bone remodeling. *J. Child Neurol.* *22*, 967–973.
- Shanmugarajan, S., Tsuruga, E., Swoboda, K.J., Maria, B.L., Ries, W.L., and Reddy, S.V. (2009). Bone loss in survival motor neuron (Smn<sup>(-/-)</sup> SMN2) genetic mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Pathol.* *219*, 52–60.
- Sharma, A., Lambrechts, A., Hao, L. thi, Le, T.T., Sewry, C.A., Ampe, C., Burghes, A.H.M., and Morris, G.E. (2005). A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp. Cell Res.* *309*, 185–197.
- Shih, J.D., Waks, Z., Kedersha, N., and Silver, P.A. (2011). Visualization of single mRNAs reveals temporal association of proteins with microRNA-regulated mRNA. *Nucleic Acids Res.* *39*, 7740–7749.
- Shishikura, K., Hara, M., Sasaki, Y., and Misugi, K. (1983). A neuropathologic study of Werdnig-Hoffmann disease with special reference to the thalamus and posterior roots. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *60*, 99–106.
- Shneider, N.A., Brown, M.N., Smith, C.A., Pickel, J., and Alvarez, F.J. (2009). Gamma motor neurons express distinct genetic markers at birth and require muscle spindle-derived GDNF for postnatal survival. *Neural Develop.* *4*, 42.

- Sibley, C.R., and Wood, M.J.A. (2011). The miRNA pathway in neurological and skeletal muscle disease: implications for pathogenesis and therapy. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *89*, 1065–1077.
- Simic, G., Seso-Simic, D., Lucassen, P.J., Islam, A., Krsnik, Z., Cviko, A., Jelasic, D., Barisic, N., Winblad, B., Kostovic, I., et al. (2000). Ultrastructural Analysis and TUNEL Demonstrate Motor Neuron Apoptosis in Werdnig-Hoffmann Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *59*, 398–407.
- Simon, A.M., Hoppe, P., and Burden, S.J. (1992). Spatial restriction of AChR gene expression to subsynaptic nuclei. *Dev. Camb. Engl.* *114*, 545–553.
- Singh, R.N., Howell, M.D., Ottesen, E.W., and Singh, N.N. (2017). Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* *1860*, 299–315.
- Sinha-Hikim, I., Artaza, J., Woodhouse, L., Gonzalez-Cadavid, N., Singh, A.B., Lee, M.I., Storer, T.W., Casaburi, R., Shen, R., and Bhasin, S. (2002). Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* *283*, E154–E164.
- Sinha-Hikim, I., Taylor, W.E., Gonzalez-Cadavid, N.F., Zheng, W., and Bhasin, S. (2004). Androgen Receptor in Human Skeletal Muscle and Cultured Muscle Satellite Cells: Up-Regulation by Androgen Treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 5245–5255.
- Sintusek, P., Catapano, F., Angkathunkayul, N., Marrosu, E., Parson, S.H., Morgan, J.E., Muntoni, F., and Zhou, H. (2016). Histopathological Defects in Intestine in Severe Spinal Muscular Atrophy Mice Are Improved by Systemic Antisense Oligonucleotide Treatment. *PLoS One* *11*, e0155032.
- Siu, P.M. (2009). Muscle apoptotic response to denervation, disuse, and aging. *Med. Sci. Sports Exerc.* *41*, 1876–1886.
- Skordis, L.A., Dunckley, M.G., Yue, B., Eperon, I.C., and Muntoni, F. (2003). Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4114–4119.
- Smerdu, V., Karsch-Mizrachi, I., Campione, M., Leinwand, L., and Schiaffino, S. (1994). Type IIX myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *267*, C1723–C1728.
- Snow, M.H. (1983). A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. *Anat. Rec.* *207*, 593–604.
- Soler-Botija, C., Ferrer, I., Gich, I., Baiget, M., and Tizzano, E.F. (2002). Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* *125*, 1624–1634.
- Soler-Botija, C., Cuscó, I., Caselles, L., López, E., Baiget, M., and Tizzano, E.F. (2005). Implication of Fetal SMN2 Expression in Type I SMA Pathogenesis: Protection or Pathological Gain of Function? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 215–223.
- Somers, E., Stencel, Z., Wishart, T.M., Gillingwater, T.H., and Parson, S.H. (2012). Density, calibre and ramification of muscle capillaries are altered in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Neuromuscul. Disord.* *22*, 435–442.
- Somers, E., Lees, R.D., Hoban, K., Sleight, J.N., Zhou, H., Muntoni, F., Talbot, K., Gillingwater, T.H., and Parson, S.H. (2015). Vascular Defects and Spinal Cord Hypoxia in Spinal Muscular Atrophy. *Ann. Neurol.* *79*, 217–230.
- Son, Y.J., and Thompson, W.J. (1995). Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* *14*, 133–141.
- Stevens, L., Bastide, B., Maurage, C.A., Dupont, E., Montel, V., Cieniewski-Bernard, C., Cuisset, J.M., Vallée, L., and Mounier, Y.

- (2008). Childhood spinal muscular atrophy induces alterations in contractile and regulatory protein isoform expressions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *34*, 659–670.
- Stienen, G.J., Kiers, J.L., Bottinelli, R., and Reggiani, C. (1996). Myofibrillar ATPase activity in skinned human skeletal muscle fibres: fibre type and temperature dependence. *J. Physiol.* *493*, 299–307.
- Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front. Cell. Neurosci.* *8*, 293.
- Stoykova, A., and Gruss, P. (1994). Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *14*, 1395–1412.
- Stroynowska-Czerwinska, A., Fiszer, A., and Krzyzosiak, W.J. (2014). The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *71*, 2253–2270.
- Sun, Y., Grimmler, M., Schwarzer, V., Schoenen, F., Fischer, U., and Wirth, B. (2005). Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy. *Hum. Mutat.* *25*, 64–71.
- Suzuki, H.I., Katsura, A., Yasuda, T., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2015). Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 512–521.
- Szliwowski, H.B., and Drochmans, P. (1975). Ultrastructural aspects of muscle and nerve in Werdnig-Hoffmann disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *31*, 281–296.
- Tajbakhsh, S. (2009). Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J. Intern. Med.* *266*, 372–389.
- Takaku, M., Tsujita, T., Horikoshi, N., Takizawa, Y., Qing, Y., Hirota, K., Ikura, M., Ikura, T., Takeda, S., and Kurumizaka, H. (2011). Purification of the human SMN-GEMIN2 complex and assessment of its stimulation of RAD51-mediated DNA recombination reactions. *Biochemistry* *50*, 6797–6805.
- Takizawa, Y., Qing, Y., Takaku, M., Ishida, T., Morozumi, Y., Tsujita, T., Kogame, T., Hirota, K., Takahashi, M., Shibata, T., et al. (2010). GEMIN2 promotes accumulation of RAD51 at double-strand breaks in homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* *38*, 5059–5074.
- Tam, S.L., and Gordon, T. (2003). Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *J. Neurobiol.* *57*, 221–234.
- Tanaka, H., Uemura, N., Toyama, Y., Kudo, A., Ohkatsu, Y., and Kanehisa, T. (1976). Cardiac involvement in the Kugelberg-Welander syndrome. *Am. J. Cardiol.* *38*, 528–532.
- Termin, A., and Pette, D. (1992). Changes in myosin heavy-chain isoform synthesis of chronically stimulated rat fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.* *204*, 569–573.
- Tews, D.S., and Goebel, H.H. (1996). DNA fragmentation and BCL-2 expression in infantile spinal muscular atrophy. *Neuromuscul. Disord.* *6*, 265–273.
- Thomson, A.K., Somers, E., Powis, R.A., Shorrock, H.K., Murphy, K., Swoboda, K.J., Gillingwater, T.H., and Parson, S.H. (2017). Survival of motor neurone protein is required for normal postnatal development of the spleen. *J. Anat.* *230*, 337–346.
- Tripsianes, K., Madl, T., Machyna, M., Fessas, D., Englbrecht, C., Fischer, U., Neugebauer, K.M., and Sattler, M. (2011). Structural basis for dimethylarginine recognition by the Tudor domains of human SMN and SPF30 proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1414–1420.
- Tsai, M.S., Chiu, Y.T., Wang, S.H., Hsieh-Li, H.M., Lian, W.C., and Li, H. (2006). Abolishing Bax-Dependent Apoptosis Shows Beneficial Effects on Spinal Muscular Atrophy Model Mice. *Mol. Ther.* *13*, 1149–1155.
- Udina, E., Putman, C.T., Harris, L.R., Tyreman, N., Cook, V.E., and Gordon, T. (2017). Compensatory axon sprouting for very slow axonal die-back in a transgenic model of spinal

- muscular atrophy type III. *J. Physiol.* *595*, 1815–1829.
- Vaidla, E., Talvik, I., Kulla, A., Sibul, H., Maasalu, K., Metsvaht, T., Piirsoo, A., and Talvik, T. (2007). Neonatal spinal muscular atrophy type 1 with bone fractures and heart defect. *J. Child Neurol.* *22*, 67–70.
- Valori, C.F., Ning, K., Wyles, M., Mead, R.J., Grierson, A.J., Shaw, P.J., and Azzouz, M. (2010). Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci. Transl. Med.* *2*, 35ra42.
- Valsecchi, V., Boido, M., De Amicis, E., Piras, A., and Vercelli, A. (2015). Expression of Muscle-Specific MiRNA 206 in the Progression of Disease in a Murine SMA Model. *PLoS ONE* *10*.
- Van Alstyne, M., Simon, C.M., Sardi, S.P., Shihabuddin, L.S., Mentis, G.Z., and Pellizzoni, L. (2018). Dysregulation of Mdm2 and Mdm4 alternative splicing underlies motor neuron death in spinal muscular atrophy. *Genes Dev.* *32*, 1045–1059.
- Viollet, L., Bertrand, S., Brunialti, A.L.B., Lefebvre, S., Burlet, P., Clermont, O., Cruaud, C., Guénet, J.-L., Munnich, A., and Melki, J. (1997). cDNA Isolation, Expression, and Chromosomal Localization of the Mouse Survival Motor Neuron Gene (*Smn*). *Genomics* *40*, 185–188.
- Vitte, J.M., Davoult, B., Roblot, N., Mayer, M., Joshi, V., Courageot, S., Tronche, F., Vadrot, J., Moreau, M.H., Kemeny, F., et al. (2004). Deletion of murine *Smn* exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload. *Am. J. Pathol.* *165*, 1731–1741.
- Volonte, C., Apolloni, S., and Parisi, C. (2015). MicroRNAs: newcomers into the ALS picture. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* *14*, 194–207.
- Vry, J., Schubert, I.J., Semler, O., Haug, V., Schönau, E., and Kirschner, J. (2014). Whole-body vibration training in children with Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* *18*, 140–149.
- Vyas, S., Béchade, C., Riveau, B., Downward, J., and Triller, A. (2002). Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2751–2764.
- Walker, M.P., Rajendra, T.K., Saieva, L., Fuentes, J.L., Pellizzoni, L., and Matera, A.G. (2008). SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 3399–3410.
- Wan, L., Battle, D.J., Yong, J., Gubitza, A.K., Kolb, S.J., Wang, J., and Dreyfuss, G. (2005). The Survival of Motor Neurons Protein Determines the Capacity for snRNP Assembly: Biochemical Deficiency in Spinal Muscular Atrophy. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 5543–5551.
- Wang, B., Yanez, A., and Novina, C.D. (2008). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5343–5348.
- Wang, C.H., Finkel, R.S., Bertini, E.S., Schroth, M., Simonds, A., Wong, B., Aloysius, A., Morrison, L., Main, M., Crawford, T.O., et al. (2007). Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J. Child Neurol.* *22*, 1027–1049.
- Watihayati, M.S., Fatemeh, H., Marini, M., Atif, A.B., Zahiruddin, W.M., Sasongko, T.H., Tang, T.H., Zabidi-Hussin, Z., Nishio, H., and Zilfalil, B.A. (2009). Combination of SMN2 copy number and NAIP deletion predicts disease severity in spinal muscular atrophy. *Brain Dev.* *31*, 42–45.
- Werdnig, G. (1891). Two early infantile hereditary cases of progressive muscular atrophy simulating dystrophy, but on a neural basis. *Arch f Psychiat* *22*, 706.
- van Wessel, T., de Haan, A., van der Laarse, W.J., and Jaspers, R.T. (2010). The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *Eur. J. Appl. Physiol.* *110*, 665–694.

- Westbury, D.R. (1982). A comparison of the structures of alpha and gamma-spinal motoneurons of the cat. *J. Physiol.* **325**, 79–91.
- White, E., Schlackow, M., Kamieniarz-Gdula, K., Proudfoot, N.J., and Gullerova, M. (2014). Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 552–559.
- Williams, A.H., Valdez, G., Moresi, V., Qi, X., McAnally, J., Elliott, J.L., Bassel-Duby, R., Sanes, J.R., and Olson, E.N. (2009). MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* **326**, 1549–1554.
- Winkler, C., Eggert, C., Gradl, D., Meister, G., Giegerich, M., Wedlich, D., Laggenbauer, B., and Fischer, U. (2005). Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev.* **19**, 2320–2330.
- Winter, J., and Diederichs, S. (2013). Argonaute-3 activates the let-7a passenger strand microRNA. *RNA Biol.* **10**, 1631–1643.
- Wirth, B., Brichta, L., Schrank, B., Lochmüller, H., Blick, S., Baasner, A., and Heller, R. (2006). Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased *SMN2* copy number. *Hum. Genet.* **119**, 422–428.
- Wishart, T.M., Huang, J.P.-W., Murray, L.M., Lamont, D.J., Mutsaers, C.A., Ross, J., Geldsetzer, P., Ansorge, O., Talbot, K., Parson, S.H., et al. (2010). SMN deficiency disrupts brain development in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4216–4228.
- Wishart, T.M., Mutsaers, C.A., Riessland, M., Reimer, M.M., Hunter, G., Hannam, M.L., Eaton, S.L., Fuller, H.R., Roche, S.L., Somers, E., et al. (2014). Dysregulation of ubiquitin homeostasis and  $\beta$ -catenin signaling promote spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.* **124**, 1821–1834.
- Wokke, J.H., Van den Oord, C.J., Leppink, G.J., and Jennekens, F.G. (1989). Perisynaptic satellite cells in human external intercostal muscle: a quantitative and qualitative study. *Anat. Rec.* **223**, 174–180.
- Wong, M., and Martin, L.J. (2010). Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2284–2302.
- Workman, E., Saieva, L., Carrel, T.L., Crawford, T.O., Liu, D., Lutz, C., Beattie, C.E., Pellizzoni, L., and Burghes, A.H.M. (2009). A SMN missense mutation complements SMN2 restoring snRNPs and rescuing SMA mice. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2215–2229.
- Wu, C.-Y., Curtis, A., Choi, Y.S., Maeda, M., Xu, M.J., Berg, A., Joneja, U., Mason, R.W., Lee, K.H., and Wang, W. (2011). Identification of the phosphorylation sites in the survival motor neuron protein by protein kinase A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1814**, 1134–1139.
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.-D., Yartseva, V., Šestan, N., and Steitz, J.A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell* **155**, 1568–1580.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol. Rev.* **93**, 23–67.
- Ymlahi-Ouazzani, Q., Bronchain, O.J., Paillard, E., Ballagny, C., Chesneau, A., Jadaud, A., Mazabraud, A., and Pollet, N. (2010). Reduced levels of survival motor neuron protein leads to aberrant motoneuron growth in a *Xenopus* model of muscular atrophy. *Neurogenetics* **11**, 27–40.
- Young, P.J., Day, P.M., Zhou, J., Androphy, E.J., Morris, G.E., and Lorson, C.L. (2002). A Direct Interaction between the Survival Motor Neuron Protein and p53 and Its Relationship to Spinal Muscular Atrophy. *J. Biol. Chem.* **277**, 2852–2859.

- Zainul, Z. (2014). Terminal Schwann Cells Lead Synapse Remodelling following Injury(1,2). *ENeuro* 1.
- Zerres, K., Rudnik-Schöneborn, S., Forrest, E., Lusakowska, A., Borkowska, J., and Hausmanowa-Petrusewicz, I. (1997a). A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J. Neurol. Sci.* 146, 67–72.
- Zerres, K., Wirth, B., and Rudnik-Schöneborn, S. (1997b). Spinal muscular atrophy—clinical and genetic correlations. *Neuromuscul. Disord.* 7, 202–207.
- Zhang, H., Xing, L., Rossoll, W., Wichterle, H., Singer, R.H., and Bassell, G.J. (2006). Multiprotein Complexes of the Survival of Motor Neuron Protein SMN with Gemins Traffic to Neuronal Processes and Growth Cones of Motor Neurons. *J. Neurosci.* 26, 8622–8632.
- Zhang, H., Xing, L., Singer, R.H., and Bassell, G.J. (2007). QNQKE targeting motif for the SMN-Gemin multiprotein complex in neurons. *J. Neurosci. Res.* 85, 2657–2667.
- Zhang, Z., Lotti, F., Dittmar, K., Younis, I., Wan, L., Kasim, M., and Dreyfuss, G. (2008). SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* 133, 585–600.
- Zhang, Z., Pinto, A.M., Wan, L., Wang, W., Berg, M.G., Oliva, I., Singh, L.N., Dengler, C., Wei, Z., and Dreyfuss, G. (2013). Dysregulation of synaptogenesis genes antecedes motor neuron pathology in spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 19348–19353.
- Zhao, X., Feng, Z., Ling, K.K.Y., Mollin, A., Sheedy, J., Yeh, S., Petruska, J., Narasimhan, J., Dakka, A., Welch, E.M., et al. (2016). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and efficacy of a small-molecule SMN2 splicing modifier in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1885–1899.
- Zhou, C., Feng, Z., and Ko, C.-P. (2016). Defects in Motoneuron–Astrocyte Interactions in Spinal Muscular Atrophy. *J. Neurosci.* 36, 2543–2553.
- Zhou, H., Arcila, M.L., Li, Z., Lee, E.J., Henzler, C., Liu, J., Rana, T.M., and Kosik, K.S. (2012). Deep annotation of mouse iso-miR and iso-moR variation. *Nucleic Acids Res.* 40, 5864–5875.