



HAL
open science

Défauts intrinsèques de motoneurones spinaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites issues d'individus atteints de différentes formes de Sclérose Latérale Amyotrophique

Cynthia Lefebvre Omar

► **To cite this version:**

Cynthia Lefebvre Omar. Défauts intrinsèques de motoneurones spinaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites issues d'individus atteints de différentes formes de Sclérose Latérale Amyotrophique. Neurosciences. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT: 2018SORUS507. tel-03125249

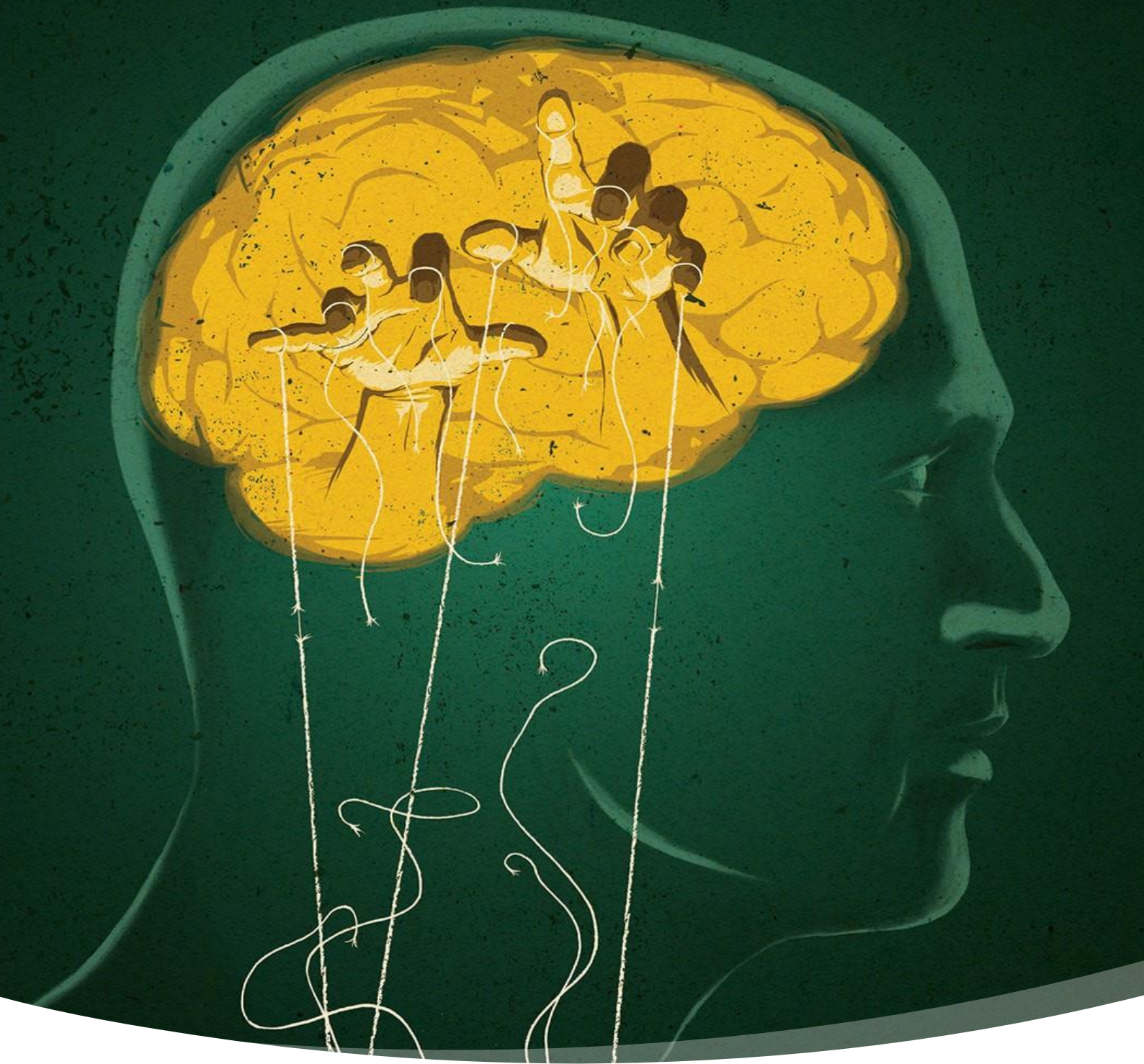
HAL Id: tel-03125249

<https://theses.hal.science/tel-03125249>

Submitted on 29 Jan 2021

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.



Défauts intrinsèques de motoneurones spinaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites issues d'individus atteints de différentes formes de Sclérose Latérale Amyotrophique

Cynthia LEFEBVRE OMAR

Directeur de thèse : Dr Delphine BOHL

« ALS » *from Nature Outlook Oct 2017*

Image de couverture : Mark Smith
Confirmation d'affectation No 6064

Sorbonne Université

Ecole Doctorale Cerveau, Cognition, Comportement (ED3C)

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière

Défauts intrinsèques de motoneurones spinaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites issues d'individus atteints de différentes formes de Sclérose Latérale Amyotrophique

Par Cynthia LEFEBVRE OMAR

Thèse de doctorat en Neurosciences

Dirigée par le Dr Delphine BOHL

Présentée et soutenue publiquement le 29 novembre 2018

Devant un jury composé du :

Pr Rachel SHERRARD

Dr Cécile MARTINAT

Dr Jacques DURAND

Dr Christophe LETERRIER

Pr David DEVOS

Dr Delphine BOHL

Présidente du jury

Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

A mes grands-parents,
Mme Colette et Pr Jean-Pierre Babary

REMERCIEMENTS

Merci au Pr Alexis Brice pour l'accueil dans son laboratoire.

Je remercie le labex Revive pour avoir financé ces quatre ans de thèse.

Je tiens à remercier le Dr Cécile Martinat, le Dr Jacques Durand, le Pr Rachel Sherrard, le Dr Christophe Leterrier et le Pr David Devos de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Merci au Dr Cécile Martinat et au Dr Jacques Durant d'avoir accepté de relire mon manuscrit et d'en être les rapporteurs.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au Dr Delphine Bohl. Merci de m'avoir fait confiance. J'ai conscience de la chance que j'ai eue de travailler à tes côtés. Ce furent quatre années riches et passionnantes, et j'ai hâte de continuer à appliquer tout ce que tu m'as transmis. Merci beaucoup pour toute ton aide, ta disponibilité et tes conseils depuis mon arrivée. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi et Elise, la DreamTeam, vous me manquez déjà.

Mes remerciements vont également au Dr Séverine Boillée, au Dr Stéphanie Millescamps, au Dr Christian Lobsiger, au Pr Danielle Seilhan et au Dr François Salachas. Merci Séverine, de m'avoir accueilli dans ton équipe. Merci à vous pour tous les conseils, les réunions constructives chaque semaine, les discussions toujours pleines d'enthousiasme et de suggestions.

Merci à Geoffroy Goujon et Elise Liu. Sans vous cette thèse n'aurait pas été la même. Elise, toujours si enthousiaste, et ce même pour être mes poignets lorsque je n'en avais plus. Merci pour ton amitié, toutes tes attentions et de toujours trouver les mots. Merci d'avoir été mon complice scientifique et extra-scientifique. Merci pour ton aide précieuse depuis ton arrivée et pour la relecture de mon manuscrit. Bon courage pour la suite, je ne doute pas que tu sauras faire de cette thèse une réussite. Je ne serai jamais loin.

Merci à tous nos collaborateurs sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Merci à Stéphanie Bigou, Clément Daube, Sophie Duffaure, Julie Pernelle, Dania Shabani, Zoi Erpapazoglou pour les astreintes du samedi et pour avoir fait de la plateforme iPSC un endroit où l'on aime travailler. Clément, merci mille fois pour toutes tes attentions, tes mots et ton soutien chaque matin.

Merci au Dr Carine Dalle, David Akbar, Aymeric Millecamps, Asha Baskaran, Dominique Langui, Aurélien Dauphin, Julien Dumont, au Dr Christophe Préhaud et au Dr Stéphane Nédélec pour leur disponibilité et leur aide. Merci au Dr Mélina Thétiot et au Dr Anne Desmazières. Merci au Dr Boris Lamotte D'Incamps, à Pierre de la Grange, Noémie Robil et à Xavier Lejeune. Merci au Dr Maria Grazia Biferi et au Dr Marisa Capella. Merci au Dr Wenting Guo et toute l'équipe du Dr Van Den Bosch pour leur travail et leur accueil à Louvain. Merci au Dr Carine Dalle et au Dr Monique Lafon pour la relecture de ce manuscrit. Merci au Dr Jean-Michel Peyrin, au Dr Etienne Jacotot et au Dr Gilles Carnac. Merci au Dr Nerea Moreno García et au Dr Claudio Hetz.

Merci à Aude Chiot et au Dr Elisa Teyssou. Avoir été trois doctorantes de la même année aura été une force. Merci d'avoir été là dès lors que j'en ressentais le besoin. Aude, mille mercis de me soutenir depuis le master. Au Dr. Matthieu Ribon, merci pour toutes tes attentions et ton aide.

Merci à Maha et Valéria pour la relecture de ce manuscrit. Merci pour votre présence et votre amitié. Maha, courage pour la suite, je sais que tu sauras transformer ce défi en succès. Andrei, merci pour tes conseils et ta bienveillance. Courage pour les mois qui suivent. Je sais que cette année sera pour toi pleine de succès et que tu sauras allier sciences et médecine comme tu l'as si bien fait durant ton master. Anne-Sophie Montero, médecin en or, merci pour tous tes précieux conseils et ton soutien jusqu'à la fin. Merci encore à tous les autres membres de l'équipe : Manel, Céline, Félix, François, Clémentine, Roselina, Laura et Coline.

Merci aux doctorants de m'avoir fait l'honneur de les représenter au comité d'animation scientifique de l'institut, que je remercie de nous donner autant d'opportunités. Je fus honorée d'en faire partie. Un merci particulier à Nokia Duong et au Dr Alexandra Auffret. Je remercie également chaleureusement le Dr Patricia Oliviero. Merci pour ton soutien et merci de m'avoir ouvert les portes de la communication et de la vulgarisation des sciences auxquelles j'ai pris un réel plaisir.

Je voudrais remercier très vivement tous les membres, passé et présent de l'institut ainsi que mes amis que je n'aurai pas la place de citer, merci pour vos encouragements, votre compréhension et votre aide, de près ou de loin, tout au long de ces quatre années d'études.

Firas, Talal, Calam et Calamiens, merci d'avoir mis de la poésie dans ma vie. Merci d'avoir rythmé mes semaines, d'avoir rechargé mes batteries, merci pour votre aide, vos encouragements et votre amitié.

A mi familia, de Laredo o Bilbao hasta Santiago, cruzando por Madrid y al lado del pasillo. Gracias por su enseñanza, su amistad, su apoyo, su felicidad y su amor sin condiciones. Quiero que sepan que tienen una parte muy especial en mi corazón. A ma famille, quelle chance ai-je de vous avoir à mes côtés. Si loin, et pourtant si près, je ne tiendrais pas ici sans vous. Merci pour votre soutien sans failles et votre amour sans limites. Une pensée spéciale pour mon jumeau Adrien, mon mari Mokhtar pour son soutien, et à mes parents Marie-Laure et Laurent pour leurs encouragements. Mathieu, beaucoup de pensées pleines d'espoir vont vers toi, nous t'attendons tous.

Les chiffres clés :

- 4 ans de thèse
- 40 différenciations
- 1104201400 noyaux comptés
- 5760 puits ensemencés
- 5700 lamelles retournées
- 2 tendinites
- et beaucoup trop de café

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit sont le fruit d'un travail principal réalisé à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM, Paris), au sein du groupe du Dr Delphine Bohl dans l'équipe du Dr Séverine Boillée et de deux études collaboratives avec d'une part l'équipe de Dr Ludo Van Den Bosch (VIB, Louvain) et d'autre par l'équipe du Dr Monique Lafon (Institut Pasteur, Paris).

Localisé au sein de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière où la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) a été décrite pour la première fois par Jean-Martin Charcot en 1865, l'ICM est un institut de recherche qui regroupe 25 équipes travaillant sur les maladies du système nerveux central.

L'équipe du Dr Séverine Boillée a été créée en janvier 2014 et est intitulée « Sclérose Latérale Amyotrophique : causes et mécanismes de la dégénérescence des neurones moteurs ». Cette équipe est constituée de 4 chercheurs statutaires qui développent des projets de recherche fondamentale pour mieux comprendre cette maladie hétérogène, dévastatrice et sans traitement curatif qu'est la SLA : génétique de la SLA, études et développement de modèles animaux et cellulaires de la SLA, études sur prélèvements de patients. L'équipe inclue également le clinicien Dr François Salachas, le responsable du plus grand centre référence SLA en France (situé dans les locaux de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière) ainsi que le Dr Danielle Seilhan qui est anatomopathologiste. C'est à l'aide de ce centre de référence SLA que le Dr Bohl a pu mettre en place un protocole clinique pour avoir accès à des biopsies cutanées de patients présentant différentes formes de SLA, afin de développer des modèles basés sur les cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSC). En parallèle, c'est grâce au Dr Seilhan que nous avons eu accès à des tissus post-mortem de patients, afin de comparer nos observations faites sur les iPSC humaines avec des tissus de patients.

Ainsi mon projet de thèse a porté sur la mise en place, dans le groupe, d'un protocole décrit dans la littérature pour générer des cultures pures de motoneurones (MNs) à partir de clones d'iPSC de différents patients atteints de SLA ainsi que de sujets contrôles. Ces clones d'iPSC avaient été générés au préalable par d'autres personnes du groupe ou bien au sein de la plateforme CELIS-iPSC, plateforme dédiée à la génération d'iPSC et de leurs clones isogéniques, sous la direction du Dr Bohl. Une fois le protocole mis en place, les objectifs du projet ont été d'une part de rechercher des défauts phénotypiques dans les MNs des patients (agrégats protéiques, mort cellulaire), de réaliser des analyses en électrophysiologie, et enfin de tester une nouvelle molécule neuroprotectrice développée par l'équipe du Dr Lafon. De façon plus globale, il était également prévu de réaliser une étude par séquençage des ARNs des MNs de patients.

Lors de ces travaux, je me suis rendu compte que la description synthétique de la SLA ne représentait pas l'hétérogénéité de la pathologie et que les iPSC s'imposaient comme un atout dans la modélisation de ce syndrome. Pour ces raisons, j'ai choisi de présenter la pathologie en suivant cette notion d'hétérogénéité, notamment dans le premier chapitre où peuvent s'apprécier

la diversité génétique, clinique et neuropathologique de la SLA. L'accent est mis sur les analyses d'excitabilité des patients SLA et la description des tissus *post-mortem* auxquels seront comparés les MNs dérivés d'iPSC afin de valider le modèle dans la partie « résultats ».

Est ensuite décrite la diversité des mécanismes découverts dans des modèles animaux et qui seraient mis en jeu dans la mort spécifique des MNs chez les patients. Dans cette seconde partie de l'introduction est introduit le rôle de chaque cellule dans l'initiation ou la progression de la pathologie, et notamment du MN impliqué dans le déclenchement de la SLA.

Le MN étant la cible première de la dégénérescence, un chapitre entier lui est consacré avec la présentation des neurones moteurs spinaux au sein de la voie pyramidale. Sont présentés : les différents types de neurones moteurs et l'importance de leurs différences car tous ne sont pas affectés de la même manière dans la SLA. En effet, une des problématiques qui ressort de la littérature et des publications concernant les MNs dérivés d'iPSC est l'absence d'une description précise du type MN généré. Or, tous les MNs n'ont pas la même vulnérabilité à la SLA. De plus le MN est constitué de différents compartiments qui peuvent être affectés différemment dans la SLA. C'est ce qui sera abordé avec notamment une région peu étudiée du MN : le segment initial de l'axone, qui joue un rôle crucial pour la polarisation et l'intégrité axonale.

Durant ces 4 années de thèse, des articles scientifiques décrivant des modèles iPSC de SLA ont été publiés. Un chapitre leur est donc consacré afin de synthétiser l'état de l'art à ce sujet. Le chapitre débute par la description de la génération et de la différenciation des MNs au cours du développement. Cette description a été fondamentale à mes yeux puisqu'elle m'a permis de mieux comprendre les nombreux protocoles publiés pour générer des cultures plus ou moins pures de MNs. Cela m'a notamment permis d'être très reproductible dans mes expériences et j'ai aussi pu améliorer la quantité de MN produits et la qualité de mes cultures lors de la mise place du protocole de différenciation des iPSC en MNs spinaux, publié par le Dr Stéphane Nedelec et le Dr Cécile Martinat (Maury et al., 2015).

Enfin, la SLA étant une maladie incurable, c'est pour mieux comprendre ce qui a été fait en terme de thérapeutique et pour mieux envisager de nouvelles approches, que le dernier chapitre porte sur la thérapie de la SLA. Ce chapitre est le fruit d'une réflexion autour du projet et du modèle étudié puisque les MNs dérivés d'iPSC peuvent permettre le criblage et le test de molécules à potentiel thérapeutique. D'autre part, c'est aussi le fruit d'une réflexion en pensant aux familles touchées par la SLA. Finalement, ce dernier chapitre permet d'appréhender de façon plus combative la SLA et de découvrir le potentiel translationnel des cellules souches, non pas au travers de la cellule différenciée comme remplacement de la cellule dégénérée mais comme interface de criblage patient-spécifique et la découverte de mécanismes pathologiques et de potentiels biomarqueurs.

A la suite de cette introduction, sont décrit les objectifs et l'état de l'art à mon arrivée au laboratoire. Le chapitre suivant décrit les résultats obtenus en 3 parties :

- la première partie concerne mon travail de thèse principal sous forme d'article rédigé en anglais et introduit en français. J'y compare les phénotypes intrinsèques aux MNs dérivés d'individus ayant des formes distinctes de SLA.
- la seconde partie décrit le travail réalisé en collaboration avec le Dr Wenting Guo (Louvain) dans le laboratoire du Dr Ludo Van Den Bosch qui a abouti sur un article publié en 2017. Ce travail a permis de réaliser parallèlement à nos expériences des analyses sur d'autres patients dans le même contexte expérimental.
- la dernière partie décrit les résultats obtenus en collaboration avec le Dr Monique Lafon et le Dr Christophe Préhaud qui concernent le test d'une molécule à visée thérapeutique sur les MNs dérivés de patients SLA (d'où l'intérêt du chapitre 5).

J'ai conclu ce manuscrit par une discussion et la présentation de perspectives possibles à ce travail.

Enfin, je souhaite souligner que ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans les nombreuses collaborations et discussions élaborées depuis 4 ans, extra et intra-muros à l'équipe.

L'ICM est un centre de recherche qui permet d'échanger avec différentes équipes ayant des compétences et des connaissances différentes qui ont favorisé et permis mon travail tout au long de ces 4 années. L'ICM héberge des start-up telles que Genosplice avec qui nous avons travaillé pour l'analyse du séquençage de l'ARN. Travailler à l'ICM, c'est aussi avoir accès à des plateformes technologiques de pointe qui permettent un échange de compétences. Je citerai notamment ICONICS, la plateforme de bioinformatique et biostatistique, les plateformes d'exploration cellulaire tels que CELIS, la plateforme de culture cellulaire, CELIS-IPS et CELIS-EPHYS, respectivement spécialisées dans la culture d'iPSC et les enregistrements électrophysiologiques ainsi que ICM.Quant, plateforme d'imagerie, avec lesquelles j'ai étroitement travaillé.

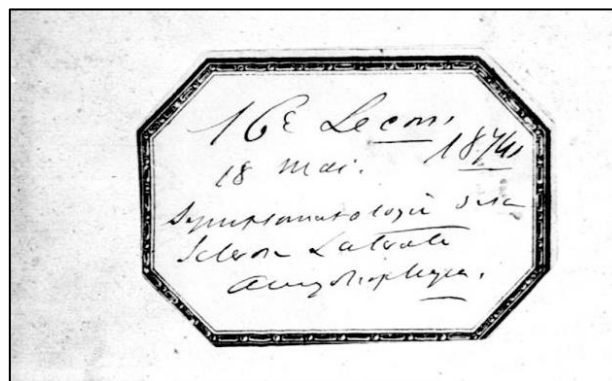
La participation de chacun est décrite à la fin du premier article p. 199 et 200 dans les parties «Acknowledgments» et «Authors contributions», ainsi que dans la partie Remerciements (p.3).

TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
AVANT-PROPOS	5
Chapitre 1 : LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE ET SON HETEROGENEITE	13
Généralités	13
I. Les différentes formes de SLA	15
1. <i>SOD1 : Superoxide dismutase 1</i>	17
2. <i>TARDBP : TransActive response DNA-Binding Protein</i>	17
3. <i>FUS : FUSed in sarcoma</i>	19
4. <i>C9ORF72 : chromosome 9 open reading frame 72</i>	19
5. SLA sporadique.....	20
II. Représentation phénotypique	22
1. L'apparition des symptômes moteurs et leurs évolutions	23
2. Les phénomènes extramoteurs.....	24
3. La progression et la survie	25
III. Neuropathologie	26
1. Neuropathologie macroscopique et cellulaire	27
2. Neuropathologie moléculaire	27
Chapitre 2 : LES MECANISMES INTRINSEQUES AUX MOTONEURONES AU TRAVERS DES ANIMAUX MODELES DE SLA	37
I. Les souris modèles de SLA	37
II. L'initiation de la SLA est intrinsèque aux motoneurones	38
III. Les mécanismes intrinsèques aux motoneurones	41
1. Métabolisme protéique	42
2. Métabolisme des ARNs.....	44
3. Structure axonale et désorganisation du cytosquelette	46
4. Métabolisme énergétique	48
5. Excitotoxicité	49
Chapitre 3 : LES MOTONEURONES, CLEFS DU MOUVEMENT VOLONTAIRE	51
I. De l'idée au mouvement	51
1. La voie pyramidale	51
2. La voie extrapyramidale	53
II. L'excitabilité des motoneurones de patients SLA	54
III. La diversité des motoneurones spinaux	56
1. Du point de vue anatomique	56
2. Du point de vue fonctionnel.....	57
III. Vulnérabilité des motoneurones à la SLA	59
IV. La vulnérabilité subcellulaire	62

1. La vulnérabilité des différents compartiments du motoneurone	62
2. Le cône d'implantation de l'axone et son segment initial.....	63
Chapitre 4 : LES MOTONEURONES DERIVES DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES HUMAINES POUR COMPRENDRE LES MECANISMES AUTONOMES DE LA SLA	69
I. La neurogenèse des MNs spinaux	69
1. Dans le développement	69
2. A partir de cellules souches pluripotentes induites humaines	70
II. Modélisation de la SLA avec des cellules souches pluripotentes induites humaines .	75
1. Les analyses par mutations	75
2. Les analyses électrophysiologiques	85
3. Les analyses transcriptomiques	86
4. Conclusion	88
Chapitre 5 : THERAPIE DE LA SLA	91
I. Les essais cliniques de la SLA	91
II. Les motoneurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines pour cribler des molécules à visée thérapeutique.....	97
Chapitre 6 : LES OBJECTIFS	101
Chapitre 7 : LES RESULTATS.....	103
I. Article 1 : Défauts intrinsèques de motoneurones spinaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites issues d'individus atteints de différentes formes de SLA	103
1. Introduction	103
2. Résumé des résultats	105
3. Conclusion	107
4. Article	109
II. Article 2 (collaboration) : L'inhibition de hdac6 restaure les défauts de transport axonal des motoneurones dérivés d'individus mutés au niveau du gène FUS.....	203
1. Résumé.....	203
2. Article	205
III. Analyse des effets d'une nouvelle molécule à potentiel thérapeutique	221
1. Qu'est-ce que neurovitas ?	221
2. Effets de Neurovitas sur les motoneurones humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites	222
3. Conclusion et perspective.....	223
Chapitre 8 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	225
I. Génération des iPSC	225
II. Génération des motoneurones et amélioration du modèle	228
1. Les motoneurones pour étudier les mécanismes intrinsèques	228
2. Les autres types cellulaires impliqués dans la SLA.....	229
III. La mortalité cellulaire.....	231

IV. Implémenter la culture des motoneurones en microfluidique.....	232
V. agrégats protéiques et altération du segment initial de l'axone	235
Chapitre 9 : CONCLUSION, QUAND LE DEVELOPPEMENT PERMET DE COMPRENDRE POUR SOIGNER LA DEGENERESCENCE	239
BIBLIOGRAPHIE	243
LISTE DES ABREVIATIONS.....	289
ANNEXE DES FIGURES	291
Chapitre 1 à 6.....	291
Chapitre 7.....	292
Partie 1 : Article 1	292
Partie 2 : Article 2	292
Partie 3	292
ChAPITRE 8	293
ANNEXE DES TABLEAUX.....	295
Chapitre 1 à 6.....	295
Chapitre 7.....	296
Partie 1 : Article 1	296
Chapitre 8.....	296



Etiquette des carnets de Jean-Martin Charcot. 1874.
(www.jubilothèque.upmc.fr)

CHAPITRE 1 : LA SCLEROSE LATERALE AMYOTROPHIQUE ET SON HETEROGENEITE

GENERALITES

La plupart du temps, le patient vient consulter car il a du mal à faire de simples tâches. Il a du mal à faire ses lacets et à tenir son stylo pour écrire, il tombe régulièrement, n'arrive pas à soulever son pied, ou a du mal à s'exprimer et se réveille en sueur parce qu'il n'arrive pas bien à respirer. Insidieusement, la maladie commence localement. Quel que soit le premier segment atteint, l'affection prend fréquemment la casquette d'une autre, retardant le diagnostic de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot^{1,2} (**Encadré 1**).

Implacable, elle est la plus fréquente des maladies du motoneurone (MN) chez l'adulte et la plus commune des maladies rares. Ce sont près de 4000 personnes qui vivent en France avec la SLA, mais l'évolution foudroyante de la maladie fait que sa prévalence reste faible : environ 1800 nouveaux cas par an. Effectivement, le pronostic est sombre. L'espérance de vie médiane des patients est de 18 à 24 mois après le diagnostic. Néanmoins, dix pour cent d'entre eux survivront plus de dix ans avec cette maladie qui est fatale, sans thérapie efficace à ce jour (www.invs.santepublique.fr).

Cette maladie entraîne la dégénérescence puis la mort des neurones moteurs du cerveau et de la moelle épinière. La SLA touche les deux catégories de neurones moteurs, les neurones du cortex moteur et les MNs. Le soma des neurones du cortex moteur se connectent à des MNs au niveau du tronc cérébral ou de la moelle épinière. Ces derniers agissent directement sur les muscles squelettiques et provoquent une

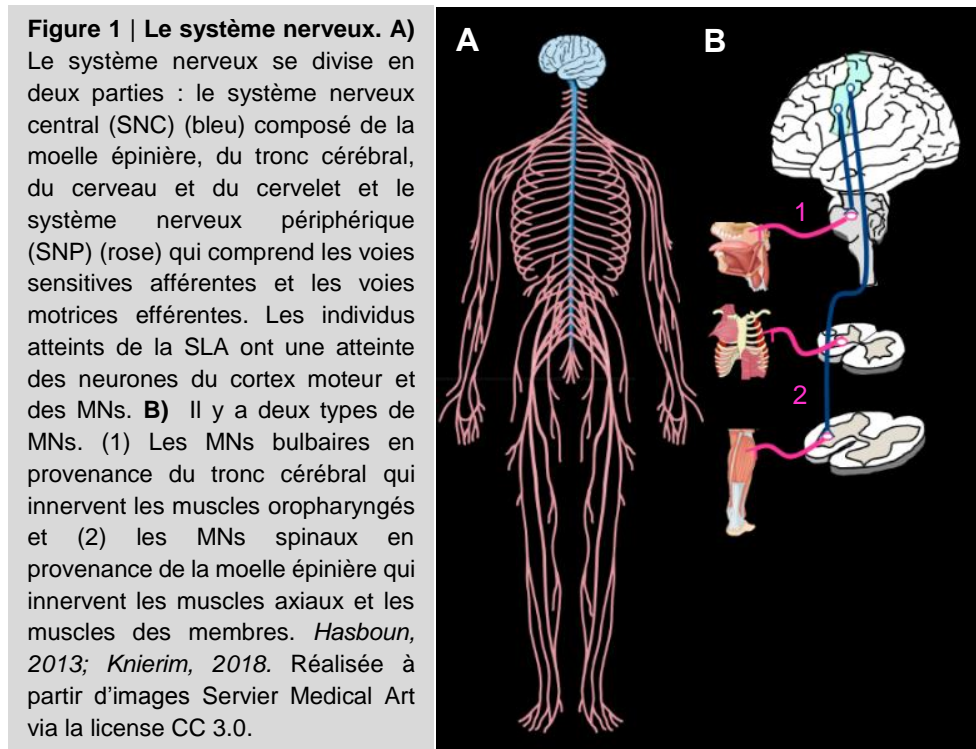
ENCADRE 1. HISTORIQUE

À 40 ans, Jean-Martin Charcot est chef de service de neurologie à la Salpêtrière. Il y côtoie des patients atteints de paralysie jusqu'à leur décès, ce qui lui permet de faire le lien entre phénotype clinique et lésions anatomopathologiques. Se pensant mauvais orateur, il prépare minutieusement ses fameuses leçons données chaque mardi au sein de l'hôpital où se mêlent grandes personnalités de la société parisienne et de la scène internationale telles que Gilles de la Tourette, Babinski ou Freud. En 1865, Charcot présente le cas d'une femme diagnostiquée comme hystérique. Elle est intellectuellement stable et sans défauts sensoriels, mais a développé une faiblesse musculaire, une augmentation de tonicité et des contractures au niveau des membres. À sa mort, Charcot l'autopsie et remarque une dégénérescence de la colonne latérale de la moelle épinière (Goetz et al., 1999 ; Turner et Swash et al., 2015). Il faut attendre neuf ans plus tard pour qu'il nomme la maladie en utilisant pour la première fois le terme de « Sclérose Latérale Amyotrophique » lors de sa 16^{ème} leçon (ci-contre, extrait de ces leçons, Charcot, 1874).

¹ La SLA fut observée pour la première fois par Charles Bell en 1830 (Bell and University College, 1830) mais clairement décrite et nommée par Jean Martin Charcot.

² La bibliothèque personnelle du Pr. Charcot se trouve à la bibliothèque de l'Institut de Cerveau et de la Moelle épinière. Le plus vieux manuscrit de sa collection est un livre de sorcellerie datant du 14^{ème} siècle, « *Malleus maleficarum maleficas et earum haeresium 1487* », que J.M. Charcot utilisait pour étudier l'hystérie.

contraction. On distingue deux types de MNs inférieurs : les neurones bulbaires en provenance du tronc cérébral qui innervent les muscles oropharyngés - responsables de la parole, la déglutition - et les neurones spinaux en provenance de la moelle épinière qui innervent les muscles axiaux et les muscles des membres (**Fig. 1**). Parce que les MNs dégénèrent, le cerveau perd progressivement son habileté à amorcer et contrôler le mouvement. Alors que les muscles s'atrophient, le patient se paralyse graduellement jusqu'à une insuffisance respiratoire, responsable du décès dans la majorité des cas.



Le modèle simplifié de la description de la SLA cache un des traits inhérents à sa compréhension : son hétérogénéité de l'échelle génétique à sa manifestation phénotypique. Dorénavant, la SLA est définie comme un « groupe de maladies neurologiques » (www.ninds.nih.gov, 2018) qui fait partie d'un continuum avec la démence fronto-temporale (DFT) (Es et al., 2017). Même si la SLA est souvent décrite comme une maladie qui n'affecte que le système moteur, plus de la moitié des patients développent aussi des troubles cognitifs ou comportementaux et près de 10 % d'entre eux seront diagnostiqués avec une DFT. La DFT est caractérisée par des changements de comportement et de personnalité associée à l'atrophie des régions corticales fronto-temporales (Es et al., 2017).

Les mécanismes étiologiques de la SLA et les bases génétiques, moléculaires et cellulaires sous-jacentes y sont très complexes. Cela explique la variation des symptômes cliniques de chaque patient et la difficulté de poser un diagnostic et un pronostic. Il est donc essentiel de comprendre toute la disparité que comporte la SLA pour y faire face. Seront donc d'abord présentées dans ce chapitre la génétique de la SLA puis la représentation phénotypique des

différentes formes. Enfin, seront exposés les marqueurs neuropathologiques caractéristiques du syndrome.

I. LES DIFFERENTES FORMES DE SLA

Comme d'autres pathologies neurodégénératives, environ 90 % des individus atteints de SLA sont sporadiques (SALS) (Talbot et al., 2016). Au 19^{ème} siècle on pensait encore que la SLA n'était pas héréditaire, jusqu'à ce que Sir William Osler ne décrive la famille Farr (Osler, 1880). En étudiant les descendants de cette famille du Vermont, l'équipe de Teepu Siddique relie leur maladie au chromosome 21 (Siddique and Ajroud-Driss, 2011; Siddique et al., 1991). Deux ans plus tard, en 1993, un premier gène causatif est découvert : *SOD1*, codant pour la Superoxyde Dismutase 1 (Rosen et al., 1993).

La découverte de nouveaux gènes associés à la SLA s'est considérablement accélérée ces dernières années (**Fig. 2**). Plus d'une vingtaine de gènes et plus de 120 variants génétiques à risque ont été découverts. La majorité des mutations sont hétérozygotes dominantes, signifiant qu'une seule copie mutée du gène est suffisante pour induire la maladie. La pathogénicité de la plupart des mutations serait due à un gain de fonction toxique et/ou à une perte de fonction du gène (Bettencourt and Houlden, 2015; Brown and Al-Chalabi, 2017; Ghasemi and Brown, 2018).

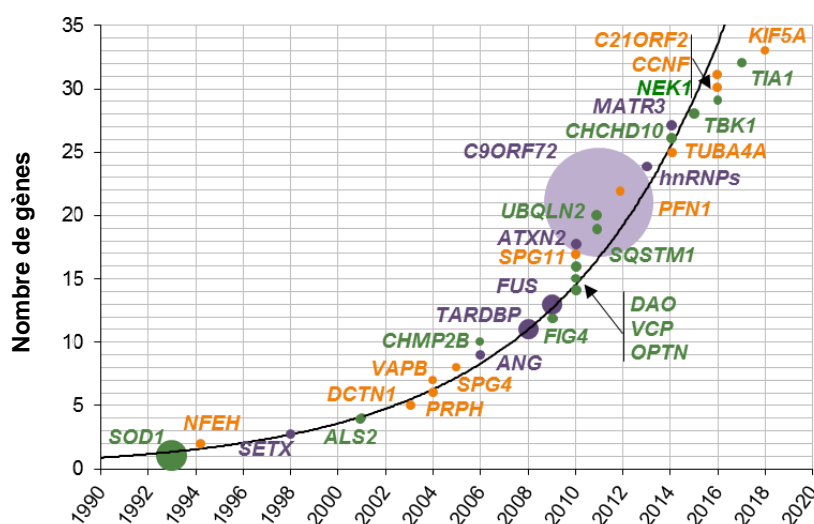


Figure 2 | Augmentation exponentielle de la découverte des gènes associés à la SLA en fonction du temps et les mécanismes mis en jeu. La découverte de gènes associés à la SLA s'est accélérée grâce aux études d'association à l'échelle du génome et du séquençage exomique. Ces gènes peuvent être regroupés en fonction des mécanismes dans lesquels ils sont impliqués : l'homéostasie protéique (vert), le métabolisme des ARNs (violet) et le cytosquelette (orange). La taille de chaque cercle reflète la proportion des cas familiaux (Bettencourt and Houlden, 2015; Brown and Al-Chalabi, 2017; Ghasemi and Brown, 2018)

Aujourd'hui, on peut distinguer trois grands groupes de gènes : les gènes impliqués dans (i) le métabolisme de l'ARN ou de l'ADN tels que *FUS* ou *TARDBP*, (ii) l'homéostasie protéique comme *SQSTM1/p62* ou *OPTN*, et (iii) le cytosquelette avec des mutations au niveau du gène *PFN1* ou *TUBA4A* (Brown and Al-Chalabi, 2017)(Fig. 2).

A ce jour, les expansions dans le gène *C9ORF72* et les mutations dans les gènes *SOD1*, *TARDBP* et *FUS* expliquent jusqu'à 60% des formes familiales et 10% des formes sporadiques (Laferriere and Polymenidou, 2015) (Fig. 3). Cependant la fréquence des causes génétiques héréditaires est hétérogène au sein de la population (Fig. 4). Millecamps et al. ont montré qu'elle variait en fonction de l'âge à la déclaration des premiers symptômes. En France par exemple, les mutations *FUS* sont les plus fréquentes chez les formes jeunes et représentent jusqu'à 35% des formes familiales chez les moins de 40 ans (Millecamps et al., 2012).

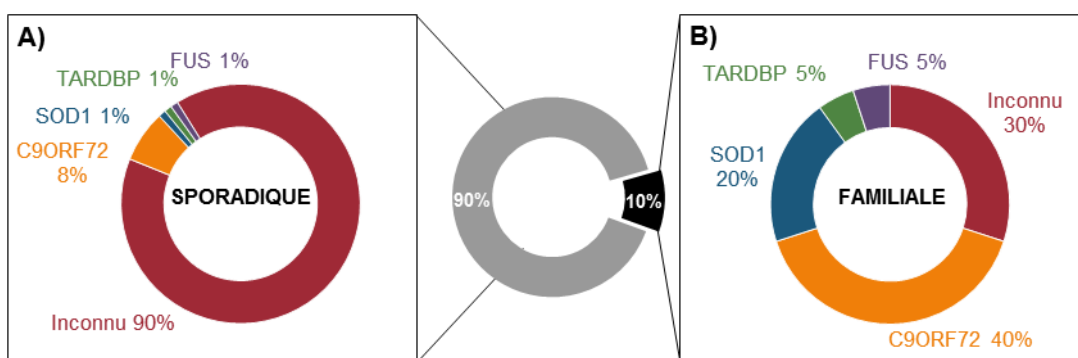


Figure 3 | Les causes génétiques de la SLA en France. A) 8% des SALS sont expliqués par des mutations au niveau du gène *C9ORF72*. Les proportions des SALS expliqués par des mutations au niveau des gènes *FUS*, *SOD1* et *TARDBP* en France ne sont pas très bien décrits. Ils représenteraient chacun près de 1% des individus. **B)** La SLA familiale est expliquée à 40% par des mutations au niveau du gène *C9ORF72*, 20% par des mutations au niveau de *SOD1* et 5% par des mutations au niveau des gènes *FUS* et *TARDBP* (Laferriere and Polymenidou et al., 2015 ; Millecamps et al., 2012).

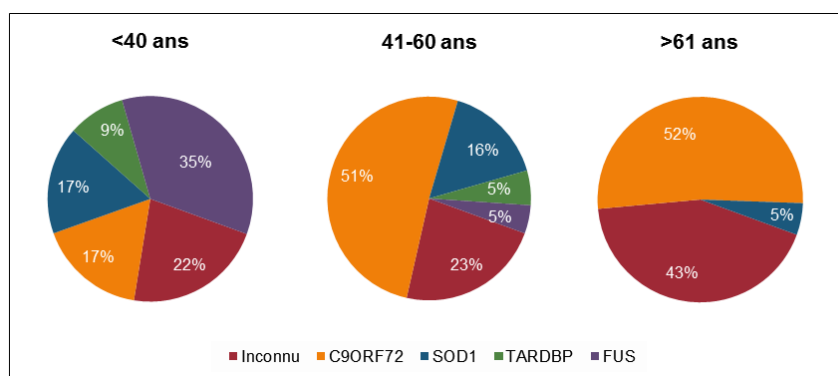


Figure 4 | Disparité de la fréquence des mutations familiales en France en fonction de l'âge auquel les premiers symptômes apparaissent. Si les expansions au niveau du gène *C9ORF72* restent la cause principale des individus déclarant la maladie après 41 ans, la plus grande partie des formes familiales juvéniles est expliquée par des mutations au niveau du gène *FUS*. Il semble que les formes de SLA associées à des mutations dans les gènes *TARDBP* et *FUS* soient déclarées en large majorité avant 60 ans (Millecamps et al. 2012).

1. SOD1 : SUPEROXIDE DISMUTASE 1

Le gène *SOD1*, de 5 exons, code pour une enzyme homodimérique capable de se lier à deux cofacteurs : le Cuivre et le Zinc nécessaires à son activité ([UniProtKB : P00441](#)). Elle métabolise les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) - déchets métaboliques produits par la cellule - en peroxyde d'hydrogène et dioxygène ($2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) protégeant ainsi l'organisme du stress oxydatif (McCord and Fridovich, 1969). C'est une protéine ubiquitaire retrouvée aussi bien dans le noyau que la membrane plasmique et le cytosol (www.proteinatlas.org).

Depuis 1993 (**Encadré 2**), près de 170 mutations ont été mises en évidence (www.hgmd.org). La quasi totalité est autosomique dominante. De façon générale, elles entraînent une maladie agressive qui débute au niveau des membres inférieurs. Les défauts cognitifs restent rares et la durée est variable avec une moyenne d'environ 6 ans mais une médiane à 3 ans (Li and Wu, 2016; Millecamps et al., 2010, 2012; Yamashita and Ando, 2015).

ENCADRE 2. HISTORIQUE

La découverte des mutations au niveau du gène *SOD1* va considérablement accélérer la recherche. Peu de temps après, le département de pathologie de l'Université de médecine de Chicago dévoile la fameuse souris transgénique « *SOD1 G93A* » surexprimant le gène *SOD1* humain muté en G93A (Dal Canto and Gurney, 1994; Gurney et al., 1994) et ouvre une voie pour tester des molécules thérapeutiques (Marx, 1994). Bien que cette mutation ait peu d'effet sur l'activité enzymatique propre à la protéine *SOD1*, la souris développe une amyotrophie progressive associée à une dégénérescence des motoneurons au niveau de la moelle épinière. Elle meurt à 5 ou 6 mois, soit plus de 15 mois avant son décès naturel, reproduisant de façon similaire la pathologie des individus atteints de SLA. Elle reste depuis le modèle le plus étudié et validé, et ce, près de 25 ans plus tard (Gurney et al., 1994; Vinsant et al., 2013a, 2013b).



Empreintes de pattes d'une souris G93A qui se paralyse peu à peu (Marx, 1994).
Rouge : pattes de gauche,
Bleu : Pattes de droite.
Réimprimée avec la permission de *Science* via le *Copyright Clearance Center* Licence No : 4398141188305.

2. TARDBP : TRANSACTIVE RESPONSE DNA-BINDING PROTEIN

TARDBP est un gène de 6 exons qui code pour la protéine TDP-43 ou « Transactive response DNA binding Protein 43kDa » ([UniProtKB : Q13148](#)). Identifiée en 1995 comme régulant la transcription du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Ou et al., 1995), on sait aujourd'hui qu'elle assure de nombreux rôles (Cohen et al., 2011). Elle intervient notamment dans le

développement (Sephton et al., 2010, 2012), la régulation du cycle cellulaire³ (Ayala et al., 2008a), la régulation de l'activité synaptique et la réparation neuronale (Han et al., 2013; Moisse et al., 2009; Sephton et al., 2011).

Protéine ubiquitaire à majorité nucléaire (www.proteinatlas.org), elle est impliquée dans plusieurs étapes de la production protéique (Ayala et al., 2008b; Cohen et al., 2011; Lagier-Tourenne et al., 2010). TDP-43 se lie à l'ARN pour assurer sa stabilité, garantie la synthèse des microARNs (miARNs)(Kawahara and Mieda-Sato, 2012), contrôle et édite les ARN messagers (ARNm) de nombreux gènes y compris du sien (Buratti et al., 2001; Lagier-Tourenne et al., 2010; Polymenidou et al., 2011). Parmi ses cibles, se trouve notamment l'ARNm du neurofilament léger (NF-L), composé majeur des MNs (Strong et al., 2007) ou HDAC6, une histone déacétylase essentielle à la régulation transcriptionnelle. TDP-43 interagit avec HDAC6 en compagnie de FUS, autre protéine dont le gène est responsable de formes familiales de la SLA (Kim et al., 2010).

En 2006, TDP-43 est suspectée pour sa présence au sein des inclusions⁴ typiquement retrouvées dans les tissus *post-mortem* de patients (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Deux ans plus tard, son gène est identifié indépendamment par deux équipes comme cause génétique de la SLA (Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008). Depuis, ce sont près de 50 mutations autosomiques dominantes qui ont été mises en évidence (www.hgmd.org).

TDP-43 contient deux domaines de reconnaissance de l'ARN (RRM) qui permettent de fixer un ARN, et un domaine C-terminal riche en glycine indispensable à ses interactions avec ARN et protéines. C'est d'ailleurs dans ce domaine que se trouve la quasi totalité des mutations (Buratti and Baralle, 2001; Chiang et al., 2016).

De façon générale et à la différence des individus mutés au niveau du gène *SOD1*, les individus caucasiens mutés au niveau du gène *TARDBP* ont d'abord une atteinte des membres supérieurs alors que les individus asiatiques ont une première atteinte bulbaire (Corcia et al., 2012a; Millecamps et al., 2010). Bien que des mutations au niveau du gène *TARDBP* puissent aussi être la cause de DFT (Synofzik et al., 2014), les patients SLA porteurs de mutations au niveau de ce gène ne développeront généralement pas de défauts cognitifs. Ils survivent en moyenne 5 ans après l'apparition des premiers symptômes (Benajiba et al., 2009; Kirby et al., 2010; Millecamps et al., 2010).

³ Des niveaux élevés de TDP-43 sont directement ou indirectement associés à certains cancers (Ayala et al., 2008a; Campos-Melo et al., 2014; Chen et al., 2017; Guo et al., 2015)

⁴ Inclusions = présence d'un corps étranger dans un ensemble homogène auquel il n'appartient pas (www.cnrtl.fr/)

3. *FUS : FUSED IN SARCOMA*

Tout juste un an après la découverte des mutations au niveau du gène *TARDBP*, deux équipes (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009) mettent en cause un gène codant pour une protéine à la structure et aux fonctions homologues : le gène *FUS* (Aman et al., 1996; Vance et al., 2013).

Quelques années plus tôt, ces deux mêmes équipes identifiaient de nouveaux *loci* et commençaient à cribler les gènes potentiellement mutés en fonction de l'expression au niveau du SNC et de leurs possibles rôles dans la pathogénicité de la SLA (Ruddy et al., 2003; Sapp et al., 2003). Avec la découverte des mutations *TARDBP*, ils se focalisaient sur des protéines de liaisons à l'ADN/ARN. Début 2009, R. H. Brown et C.E. Shaw et al. découvraient que les mutations du gène *FUS* causaient une forme familiale de SLA (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Alors que la recherche se focalisait majoritairement sur *SOD1*, les similitudes entre TDP-43 et *FUS* ont bouleversé le domaine (Lagier-Tourenne and Cleveland, 2009).

A l'origine, le gène *FUS*, pour *Fused in sarcoma*⁵, est identifié comme une partie d'un gène de fusion des liposarcomes⁶ (Croizat et al., 1993; Rabbitts et al., 1993). La protéine, connue depuis 1993, est aussi appelée «RNA-binding protein FUS» ([UniProtKB : P35637](https://www.uniprot.org/entry/P35637)).

Comme TDP-43, *FUS* est ubiquitaire et majoritairement nucléaire (www.proteinatlas.org). Pour interagir avec l'ARN, elle possède aussi un domaine RRM (Vance et al., 2013). *FUS* est engagée dans de nombreux mécanismes cellulaires : la prolifération (Ward et al., 2014), la réparation de l'ADN (Mastrocola et al., 2013) et le métabolisme de l'ARN incluant l'édition des ARNm et la synthèse des miARN (Lagier-Tourenne et al., 2010; Morlando et al., 2012).

Depuis 2009, plus de 60 mutations associées à la SLA ont été trouvées sur ce gène dont le plus grand nombre se situe dans le domaine de localisation nucléaire (www.hgmd.org). Typiquement, les individus atteints de SLA mutés au niveau du gène *FUS* manifestent les premiers symptômes précocement (avant 40 ans). Généralement sans troubles cognitifs, la localisation de la première faiblesse musculaire varie. La maladie est agressive et par conséquent leur espérance de vie est plus tragique que les patients mutés au niveau des gènes *SOD1*, *TARDBP* ou que les patients SALS (Akiyama et al., 2016; Blair et al., 2010; Millecamps et al., 2010; Yan et al., 2010).

4. *C9ORF72 : CHROMOSOME 9 OPEN READING FRAME 72*

Si le premier pas vers la découverte du gène s'est fait à Harvard avec le travail du Dr. Brown (Hosler et al., 2000), le début de l'histoire nous vient tout droit du Japon. En 1964, Dr. R. Yuasa rapporte le « premier » cas reconnu de SLA associée à une démence. S'en suivront plusieurs études,

⁵ Le gène *FUS* a un synonyme. En 1993, deux équipes l'identifient séparément : l'une l'appelle *FUS*, l'autre lui donne le nom de *TLS*, pour *Translocated in liposarcoma* ; les deux codant pour la protéine *FUS* ou *TLS*.

⁶ Tumeur maligne des tissus mous, comme la paroi des organes ou le tissu graisseux (Campos-Melo et al., 2014)

japonaises pour la majorité. De ce fait, la SLA dite « démentielle » est pensée comme une spécificité asiatique (Hirano et al., 1967; Mitsuyama, 1984; Mitsuyama and Takamiya, 1979; Mitsuyama et al., 1985; Morita et al., 1987) et est surnommée « Maladie de Yuasa-Mitsuyama ». Des cas similaires seront retrouvés outre-mer (Finlayson and Martin, 1973; Pinsky et al., 1975; Wikström et al., 1982). Toutefois il faut attendre les années 90 pour que la SLA associée à des DFT soit reconnue internationalement (Abe et al., 1997; Gentileschi et al., 1999).

C'est précisément grâce à l'étude de plusieurs familles avec DFT et SLA que l'équipe de Robert Brown rapproche la SLA type « Yuasa-Misuyama » du 9^{ème} chromosome (Hosler et al., 2000). Les analyses de liens de parenté qui suivront localisent un *locus* plus précis (Morita et al., 2006; Valdmanis et al., 2007; Vance et al., 2006) jusqu'à ce que deux groupes identifient simultanément des répétitions d'hexanucléotides GGGGCC (G4C2) au niveau du premier intron du gène *C9ORF72* dont la fonction reste en partie inconnue (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Alors que les individus sains ont environ une vingtaine de répétitions introniques, les patients atteints de SLA peuvent en avoir des centaines voire des milliers (Van Mossevelde et al., 2017). Les expansions G4C2 constituent aujourd'hui la cause génétique majeure des individus atteints de DFT et de SLA (Majounie et al., 2012).

Ubiquitaire (www.proteinatlas.org), la protéine C9ORF72 est retrouvée dans le noyau (Renton et al., 2011) ainsi que dans différents compartiments intracellulaires dont les lysosomes et les endosomes ([UniProtKB : Q96LT7](https://www.uniprot.org/entry/Q96LT7)) (Amick et al., 2016; Farg et al., 2014). Elle a été montrée comme pouvant être impliquée dans l'autophagie (Nassif et al., 2017) et le trafic endosomal (Farg et al., 2014). Récemment, deux équipes ont montré son importance dans la régulation de l'inflammation, nécessaire au bon fonctionnement des cellules microgliales et macrophagiques (Atanasio et al., 2016; O'Rourke et al., 2016).

Les individus porteurs d'un nombre anormal d'expansions ressentent majoritairement de premières faiblesses bulbaires et peuvent développer une DFT. La maladie s'étend plutôt rapidement. La corrélation entre nombre de répétitions et sévérité est encore débattue (Van Mossevelde et al., 2017). L'espérance de vie des patients reste relativement faible, le décès survenant environ 3 ans après la déclaration des symptômes (Millecamps et al., 2012).

5. SLA SPORADIQUE

La SLA est multifactorielle, avec plusieurs causes génétiques identifiées et des causes environnementales discutées (**Encadré 3**). De plus en plus d'évidences montrent que des facteurs génétiques jouent un rôle dans la pathogénicité de la forme sporadique : des mutations à faible pénétrance responsables de formes familiales, des mutations *de novo*, une susceptibilité génétique, ou des événements épigénétiques (Su et al., 2014; Tsuji, 2013).

MUTATIONS A FAIBLE PENETRANCE

Lorsque qu'une maladie se transmet de façon autosomique dominante à toutes les générations la pénétrance est dite complète. Les gènes mutés à faible pénétrance regroupent des variants génétiques qui interagissent avec des facteurs exogènes pour produire la maladie (Probst-Hensch and Morabia, 2002). Certaines mutations peuvent aussi être asymptomatiques (Murakami et al., 2001; Nogales-Gadea et al., 2004; Suthers et al., 1994). Le conseil génétique doit donc être prudent et reste difficile au vu de ces circonstances. Outre le fait qu'aucun traitement n'est disponible, il est difficile d'expliquer à des individus qu'ils pourraient ou ne pourraient pas développer une pathologie lente ou foudroyante.

MUTATIONS DE NOVO

Une fraction des formes sporadiques deviendra familiale. Chaque gène découvert associé à une SLA familiale est aussi retrouvé dans des formes sporadiques, cependant rares sont les « vrais » cas *de novo* car la plupart sont des mutations à la pénétrance incomplète (Alexander et al., 2002; DeJesus-Hernandez et al., 2010; Lattante et al., 2012). Comme le disent *Sabatelli et al.*, considérant que 50 à 60% des patients ayant une forme familiale (FALS) ont des mutations dans des gènes connus, la découverte de nouveaux gènes devrait augmenter la proportion de patients SALS dont l'étiologie génétique est connue (Sabatelli et al., 2013).

SUSCEPTIBILITE GENETIQUE

En se basant sur de grandes cohortes de patients, plusieurs études ont montré qu'une personne saine portant une mutation dans certains gènes sera plus à risque de développer une SLA. Ces gènes peuvent aussi modifier la progression de la pathologie (Chen et al., 2013; Renton et al., 2014). Par exemple, une variation au niveau du gène *NEK1*, impliqué entre-autres dans la polarité axonale ou la stabilité des microtubules, représenterait un risque pour près de 3% des individus atteints de SLA et conférerait donc une susceptibilité de la développer (Gratten et al., 2017; Kenna et al., 2016). Des délétions ou insertions dans le gène *NFEH*, codant pour des neurofilaments (NF-H) ont été associées à des SALS, bien que parfois retrouvées chez des contrôles (Al-Chalabi et al., 1999;

ENCADRE 3. LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

La SLA est considérée comme une maladie génétique complexe. Des modèles mathématiques ont postulé que les individus développant une SLA portent un nombre de variant à risque et que l'interaction avec un environnement spécifique conduit à la déclaration des symptômes (Hardiman et al., 2017).

Plusieurs hypothèses ont été suggérées par l'incidence élevée de la SLA dans certaines populations ajoutée au mode de vie particulier de ces derniers (Ingre et al., 2015). Ci-dessous deux exemples non exhaustifs :

- la consommation de β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA), proche du glutamate, au Japon sur l'île de Guaam, la péninsule de Kii et dans des régions françaises consommatrices de coquillages où la présence de BMAA a été rapportée (ANSES, 2017)

- l'activité physique intense. Par exemple, Lou Gehrig, célèbre joueur de baseball a donné son nom à la SLA aux Etats-Unis (Chio et al., 2005 ; Gallo et al., 2016)

D'autres facteurs seraient protecteurs comme le diabète de type 2 pour sa forte concentration en lipides (Kioumourtzoglou et al., 2015) ou les hormones contraceptives (Rooney et al., 2017).

Figlewicz et al., 1994). Une étude moscovite a mis en relief le risque augmenté des individus homozygotes pour le variant court de *NFEH*, soulignant l'implication du gène dans le développement et la progression de la SLA (Skvortsova et al., 2004). Aujourd'hui près d'une centaine de mutations ont été identifiées et augmenteraient le risque de développer une SLA ou modifieraient son phénotype (Ghasemi and Brown, 2018).

EVENEMENTS EPIGENETIQUES

Au niveau de la chromatine, la méthylation des histones compacte l'ADN et inhibe la transcription. Des études entre des jumeaux monozygotes, dont l'un a développé une SLA et l'autre pas (Al-Chalabi et al., 2010; Young et al., 2017), ainsi que la comparaison du taux de méthylation des cerveaux de patients SLA *post-mortem* ont mis en évidence des différences épigénétiques (Figuroa-Romero et al., 2012; Morahan et al., 2009). La plupart des différences de méthylation retrouvées sont associées à la régulation de la transcription et concernent des gènes ou des voies déjà impliquées dans la SLA qui seront exposés dans le prochain chapitre ([Chapitre 2](#)) (Morahan et al., 2009; Young et al., 2017). Les miARNs qui peuvent aussi réguler l'expression des gènes sont parfois retrouvés diminués dans la moelle épinière des tissus *post-mortem* de patients SLA (Campos-Melo et al., 2013; Figuroa-Romero et al., 2016).

II. REPRESENTATION PHENOTYPIQUE

La représentation phénotypique de la SLA est variable au niveau de l'âge de début, de son évolution ou de sa durée. Si la pathologie se déclare aux alentours de 60 ans dans la plupart des cas, les premiers symptômes peuvent apparaître aussi chez des adolescents (Turner et al., 2012). La localisation de la première faiblesse musculaire est imprévisible et bien que décrite comme affectant le système moteur les patients ne sont pas à l'abri d'un défaut cognitif ou sensoriel. Malheureusement, la survie des patients SLA est tout aussi difficile à estimer que son évolution, que ce soit pour les formes familiales ou sporadiques. Le tableau ci-contre présente la diversité des phénotypes cliniques causés par certaines mutations (**Tableau 1**).

Mutation	Age de début (ans)	Site d'initiation	Durée (mois)	
SOD1	A4V	47.8 +/- 13.3	Membre	16,8+/- 10,8
	H46R	29 +/-13,3	Membre inférieur	510+/-130,9
	D90A	56,8 +/- 15,4	Bulbaire, Membre	Homo : Lente Hétéro : Rapide
	I113T	53 (37-67)	Membre	61,2 (24-120)
	N139D	Plus précoce que les formes rapides	Membre inférieur	Lente
TARDBP	G298S	50.7 +/-6.2	Membre	27 (15–48)
	A315T	65.5 +/- 13	Bulbaire, Membre supérieur	109.7 (77–158)
	M337V	47.7 +/-8.8	Bulbaire, Membre supérieur	105.0 (12–204)
	G348C	46.4 +/- 10.7	Membre	81.3 (36–156)
	A382T	51.3 +/- 8.6	Membre supérieur +/- DFT	58.1 (17–180)
FUS	H517D	39 (37–41)	Cervical, membres proximaux	20 (12–28)
	R521C	35,3 +/- 5,1	Membre	16.1±7.7
	R521H	57,7+/-9	Membre	54,1+/-26,2
	P525L	19,5 (11-32)	Bulbaire, Spinal	15,4 (14-24)
C9ORF72	(G4C2)n	La longueur des expansions n'influencerait pas le phénotype		

Tableau 1 | Diversité des phénotypes cliniques causés par certaines mutations au niveau des gènes SOD1, TARDBP, FUS et C9ORF72.

SOD1 : A4V est une forme agressive (Cudkowicz et al., 1997). En revanche, H46R est souvent bénigne (Zou et al., 2016). D90A est la plus fréquente dans le monde et peut être homozygote ou hétérozygote (Andersen et al., 1995 ; Li and Wu et al., 2016). I113T est extrêmement variable même au sein d'une même famille, certains étant asymptomatiques (Lopate et al., 2010). N139D est une mutation rare, associée à une forme lente que j'ai étudié (Millecamps et al., 2010). **TARDBP** : Les mutations présentées font partie des mutations les plus fréquentes, dont la G348C que j'ai étudié. La mutation A382T est la plus fréquente d'entre elles (Chio et al., 2012 ; Corcia et al., 2012). **FUS** : La plupart des mutations sont concentrées sur le codon 521. Les mutations R521C et R521H sont les plus fréquentes (Susuki et al., 2010 ; Swetha et al., 2016). R521H est souvent moins agressive que les autres (Millecamps et al., 2010 ; Zou et al., 2012 ; Kwiatkowski et al., 2009). P525L est souvent une forme juvénile agressive (Conte et al., 2012) **C9ORF72** : la longueur des expansions n'influencerait pas le risque de développer une pathologie mais des longueurs intermédiaires (supérieur à 20 jusqu'à environ 30) pourraient être associées à un risque accru de développer des symptômes neuropsychiatriques (Ng. Et al, 2017). Moyenne +/- SD ou Moyenne (Ecart).

1. L'APPARITION DES SYMPTOMES MOTEURS ET LEURS EVOLUTIONS

La maladie a été décrite à toutes les tranches d'âge, les formes les plus précoces commençant avant le 25^{ème} anniversaire (Turner et al., 2012). Certaines formes génétiques prédisposent à une SLA juvénile (cf. Fig.4 p.16).

Les premières manifestations cliniques sont locales. Puisque n'importe quel muscle squelettique peut être touché, la représentation clinique de la SLA est très variable et ce même pour les formes génétiques. Les patients peuvent venir consulter pour une difficulté à articuler, des crampes au niveau du poignet ou une immobilité du pied. Chez la plupart des individus atteints, un membre supérieur ou inférieur est touché par des fasciculations et une fragilité musculaire alors que pour d'autres, le début est soit bulbaire (pour 20% d'entre eux), soit respiratoire mais dans une moindre proportion (de 3 à 5%) (Swinnen and Robberecht, 2014). La maladie prend du terrain insidieusement et se propage de façon contiguë à d'autres parties du corps, indépendamment du site d'initiation. La maladie, progressive, peut s'étendre localement : comme du pied à la jambe, ou s'étendre en contra-latéral : comme de la main gauche à la main droite, suggérant que la dégénérescence se propage le long des neurones du cortex moteur et des MNs (Ravits, 2014; Ravits et al., 2013). Il n'est pas difficile à imaginer la complexité du diagnostic au vu de la disparité du point d'initiation de la SLA et de l'hétérogénéité de la progression de la maladie. Les affections mimant la SLA sont d'ailleurs nombreuses et retardent le diagnostic d'environ 7 à 12 mois (Couratier et al., 2014; Magistris, 2006).

La SLA étant définie comme une maladie des neurones du cortex moteur et des MNs, il faut souvent attendre que la pathologie évolue pour poser le diagnostic. L'Organisation Mondiale de la Santé (www.icd.who.int) fait d'ailleurs la distinction entre paralysie bulbaire progressive, atrophie musculaire progressive, sclérose latérale primaire et sclérose latérale progressive « plus » ; mentionnant que ces pathologies peuvent évoluer vers une SLA ou en sont des variantes.

2. LES PHENOMENES EXTRAMOTEURS

Outre les phénomènes moteurs, la SLA peut être accompagnée d'autres dysfonctions neurologiques extrapyramidales, cérébelleuses ou cognitives ("SLA-plus"). Les anomalies cognitives sont les symptômes non-moteurs les plus fréquents (McCombe et al., 2017). Près de 50% des individus SLA développent des déficiences cognitives ou comportementales. La SLA et la DFT sont deux extrêmes d'un même spectre pathologique. Au niveau génétique, elles partagent entre autres les expansions au niveau du gène *C9ORF72*, conférant une DFT à la moitié des individus porteurs des expansions (Ji et al., 2017; McCombe et al., 2017). Des changements de personnalités et des changements cognitifs peuvent aussi être associés à des mutations *TARDBP*, mais rarement avec des mutations *SOD1*. Le risque de DFT est augmenté avec l'allèle *APOE-ε2* tandis que le risque de défaut cognitif est augmenté avec l'âge, ce qui n'est pas surprenant puisqu'un déclin cognitif apparaît au cours d'un vieillissement normal (Chiò et al., 2016; Harada et al., 2013).

Le cervelet est important pour certaines fonctions cognitives comme le langage et l'attention et joue un rôle important dans le contrôle moteur. Certains patients porteurs d'expansions dans le gène *ATXN2* auraient une perte des neurones du cortex cérébelleux, ce qui n'a pas été observé chez

les patients SALS ou porteurs d'expansion G4C2 (Tan et al., 2016). Des études ont montré que certains patients avaient des déficiences linguistiques (Taylor et al., 2013). Cela pourrait être dû à une atrophie de l'hippocampe qui a été corrélée à un trouble de la mémoire verbale (Abdulla et al., 2014).

Entre autres, il a aussi été rapporté que des patients pouvaient développer une diminution sensitive (Isaacs et al., 2007; Pugdahl et al., 2007), notamment chez des individus porteurs d'une mutation au niveau du gène *SOD1* (McCombe et al., 2017). Une étude de 2007 a estimé que 22% des individus atteints de SLA avaient des défauts au niveau des neurones sensitifs (Pugdahl et al., 2007).

3. LA PROGRESSION ET LA SURVIE

Alors que la survie moyenne des patients après l'apparition des premiers symptômes est de 3 à 5 ans, il est important de mentionner que certains patients survivront moins d'un an quand d'autres vivront une ou plusieurs décennies avec la maladie. Pour cette raison, essayer d'évaluer le pronostic vital de chaque patient est primordial à l'heure de l'annonce du diagnostic et de son suivi. Plusieurs facteurs démographiques, cliniques, psychologiques et biologiques rentrent en jeu (Chio et al., 2009). En conséquence, est-il possible de prédire l'évolution de la SLA au vu de cette hétérogénéité ?

Le pronostic vital est influencé par la localisation initiale de la maladie et la suite de sa progression. La détresse respiratoire entraînant le décès dans la plupart des cas, on comprend que les individus au début respiratoire auraient le pronostic le plus inquiétant (Chiò et al., 2011; Louwerson et al., 1997). Néanmoins il n'est pas forcément suivi d'une progression rapide (Shoesmith et al., 2007). Quant aux formes bulbaires, la prédiction est plus « *menaçante* » qu'un début spinal (Chiò et al., 2011; Testa et al., 2004).

L'espérance de vie des patients avec DFT est d'environ 1 an de moins que les individus atteints d'une SLA « classique », peut-être dû à la difficulté de se soumettre aux traitements (Swinnen and Robberecht, 2014).

On pourrait penser qu'un retard de diagnostic va de pair avec une hausse de la mortalité comme cela peut être le cas dans d'autres maladies. Avec la SLA, ce retard diminue avec l'agressivité de la maladie, qui progresse plus rapidement. Effectivement, le diagnostic est fortement lié à la progression de la pathologie (Chiò et al., 2011; Kollwe et al., 2008).

Bien sûr l'histoire familiale est à prendre en compte. Certaines formes héréditaires sont connues pour être associées à une plus longue durée quand d'autres, à l'inverse, le sont pour leur côté morbide (cf. [Tableau 1, p.23](#)). Prenons par exemple la forme familiale *SOD1*. La mutation A4V est connue comme très agressive. A l'opposé, la substitution H46R est associée à une SLA dont la

progression est relativement lente. Quant à la mutation I113T, elle est extrêmement variable et ce, même au sein d'une même famille. La même variabilité est retrouvée chez des patients porteurs de mutations *TARDBP* ou *FUS*.

En règle générale, plus l'âge lors du diagnostic est élevé, plus le pronostic est sombre. Les patients dont les symptômes apparaissent avant 40 ans survivraient plus de 10 ans (Preux et al., 1996; Testa et al., 2004). Or, la SLA peut aussi survenir à l'adolescence et prendre la vie en l'espace de quelques mois (Belzil et al., 2012; Millecamps et al., 2010, 2012).

En conclusion, l'hétérogénéité clinique et génétique de la SLA rend difficile le diagnostic et le pronostic de la SLA. Aujourd'hui, il n'y a pas de consensus concernant les biomarqueurs qui pourraient être utilisés pour les évaluer. Dans l'idéal, le meilleur biomarqueur serait celui qui puisse être identifié dès la phase présymptomatique et permettre de suivre la progression de la pathologie pour améliorer la prise en charge des patients (Łukaszewicz-Zajac et al., 2014; Vu and Bowser, 2017). Ainsi, les délais diagnostics pourraient être réduits. Cela faciliterait l'inclusion précoce dans un essai clinique ou la mise en place d'un traitement le plus rapidement possible qui serait donc probablement plus efficace (Benatar et al., 2016; Es et al., 2017). Les protéines du cytosquelette sont prometteuses car elles sont relarguées dans le liquide interstitiel et s'accumulent dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien (LCR) lors de la dégénérescence axonale (Łukaszewicz-Zajac et al., 2014; Vu and Bowser, 2017). Bien que non spécifique à la SLA (Khalil et al., 2018; Xu et al., 2016) plusieurs études ont montré que le taux de neurofilaments (NFs) pourrait quand même être utile au diagnostic et au pronostic (Rossi et al., 2018a; Schaepdryver et al., 2017). *Weydt et al.* ont montré que les taux de NFs légers (NF-L) et phosphorylés (pNF-H) du LCR était normaux avant l'initiation de la maladie mais qu'ils augmentaient rapidement dans les phases précoces de SLA (Weydt et al., 2016). Pour *Es et al.*, les NF-L et pNF-H dans le LCR permettraient de différencier les patients SLA des maladies voisines malgré une corrélation modérée avec la progression (Es et al., 2017). Certaines études ont proposé d'autres biomarqueurs potentiels tels que la Cystatine C, TDP-43, la ferritine, le glutamate ou des marqueurs de stress oxydatif (Costa and de Carvalho, 2016; Frijhoff et al., 2015; Hu et al., 2016; Noto et al., 2011; Shaw et al., 1995; Zhu et al., 2018); mais de nouvelles études sont nécessaires pour conclure sur leur utilité et efficacité. Il existe aussi des marqueurs électrophysiologiques qui permettraient de mesurer spécifiquement l'altération des neurones du cortex moteur ou des MNs qui seront vu plus en détails dans le [Chapitre 3](#).

III. NEUROPATHOLOGIE

Les tissus *post-mortem* représentent le plus souvent le stade final de la pathologie. Bien que leurs analyses ne renseignent pas sur l'évolution de la pathologie elles donnent des indices sur les mécanismes qui ont pu être mis en jeu lors de la dégénérescence des MNs.

1. NEUROPATHOLOGIE MACROSCOPIQUE ET CELLULAIRE

A l'autopsie, le cerveau paraît généralement normal, malgré une perte des neurones du cortex moteur⁷ (Nihei et al., 1993), comparable à ce qui est observé avec le vieillissement (Hammer et al., 1979; Hirano, 1996). Macroscopiquement, les études *en post-mortem* révèlent une moelle épinière atrophiée due à la perte des neurones et des axones myélinisés (Saber et al., 2015). Des axones en souffrance apparaissent le long de la moelle épinière et forment des renflements axonaux, signe d'une perturbation de l'organisation axonale. Pour les individus mutés au niveau du gène *SOD1*, la perte des MNs inférieurs est souvent plus importante que celle des neurones du cortex moteur (Al-Chalabi et al., 2012a; Ravits et al., 2013). Si le neuropathologiste observe une perte évidente des MNs, ces derniers ne sont pas les seuls témoins de la SLA. Une perte d'interneurones corticaux a été également mise en évidence chez certains patients (Maekawa et al., 2004; Nihei et al., 1993). Inhibiteurs, ils permettent de réguler l'excitabilité des MNs et pourraient jouer un rôle dans la pathologie.

Une gliose est aussi apparente. Les astrocytes, les précurseurs d'oligodendrocytes, les cellules microgliales paraissent réactifs⁸ (Philips and Rothstein, 2014). Les astrocytes sont les cellules les plus nombreuses du SNC et jouent de nombreux rôles dont la recapture des neurotransmetteurs. Hypertrophiés dans la moelle épinière et le cortex de patients FALS et SALS, les astrocytes pourraient exacerber la vulnérabilité des MNs (Schiffer and Fiano, 2004; Vargas and Johnson, 2010). Dans le cortex moteur et la moelle épinière de patients SLA certaines zones sont démyélinisées et les précurseurs d'oligodendrocytes hypertrophiés au niveau du cortex (Kang et al., 2013). Les marqueurs des cellules microgliales et macrophagiques sont activés dans les tissus *post-mortem*. Ces cellules pourraient agir en tant que protecteur ou être à l'inverse toxique en fonction de l'avancée de la maladie et des cytokines qu'elles relarguent (Henkel et al., 2004; Kawamata et al., 1992).

2. NEUROPATHOLOGIE MOLECULAIRE

Les corps cellulaires des MNs de patients SLA sont caractérisés par la présence d'inclusions cytoplasmiques diverses aussi bien dans le péricaryon, les dendrites et les axones (Kato, 2007). Il y en a principalement trois : les corps de Bunina, les inclusions en écheveaux et les accumulations de NFs (Al-Chalabi et al., 2012a; Kato, 2007; Mendonça et al., 2005) (**Fig.5 et Tableau 2 p.25**).

⁷ Aussi appelées cellules de Betz, après leur description par Vladimir Betz en 1874

⁸ Cellule réactive = changement de morphologie

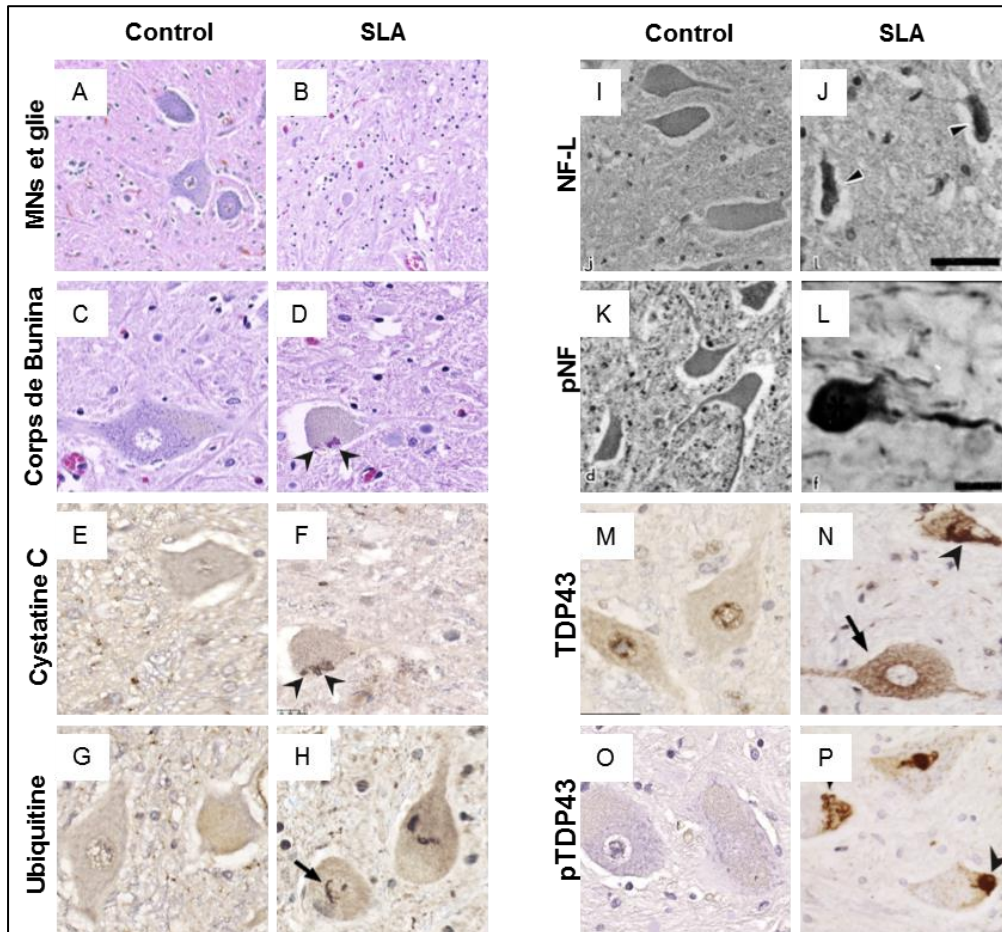


Figure 5 | Neuropathologie classique de patients atteints de SLA. (A-B, 20X) Perte des MNs et gliose de la corne antérieure de la moelle épinière d'individus SLA. **(C-D, 40X)** Corps de Bunina dans le cytoplasme de MNs SLA (flèches). [A-D : coloration hématoxyline et éosine] **(E-F, 40X)** Les corps de Bunina des MNs SLA sont positifs à la Cystatine C. **(G-H, 40X)** Inclusions en écheveaux positives à l'ubiquitine dans des MNs spinaux de la corne antérieure de la moelle épinière de patients SLA. **(I-L)** Fort marquage de NFs phosphorylés (pNF) (I,J) et NFs légers (K, L) dans les MNs SLA par rapport aux contrôles (Echelle I, K, L : 35µm, J : 10µm). **(M-N, 40X)** Inclusions diffuses (flèches) et en écheveaux (tête de flèche) de TDP-43 et absence de marquage nucléaire dans les MNs spinaux de patients SLA. **(O-P, 40X)** Inclusions denses (tête de flèche) ou en écheveaux de TDP-43 phosphorylée (pTDP-43) (flèche) dans les MNs de patients. D'après Saberi et al. 2015, réimprimée avec la permission de *Neurologic Clinics* via le *Copyright Clearance Center* Licence No : 4398850104217 et d'après *Mendonça et al. 2005*, réimprimée avec la permission de *Braz J Med Bio Res* via *CC, License 4.0*.

(i) Les corps de Bunina

Les corps de Bunina⁹ sont de petites inclusions éosinophiles¹⁰ (Bunina, 1962) (**Fig. 5**). Ils peuvent être retrouvés dans le cytoplasme du soma et des dendrites mais n'ont pas été décrits dans la partie axonale. Les corps de Bunina contiennent de la Cystatine C (Okamoto et al., 1993), de la transferrine et de la périphérine (Mizuno et al., 2006, 2011). Ils sont aussi bien observés dans les

⁹De Tat'yana Bunina, immortalisée pour avoir décrit la présence de ces inclusions dans deux patients FALS de familles différentes.

¹⁰ Eosine est un colorant acide fixant les constituants cellulaires basiques

formes sporadiques que familiales. Ces inclusions sont considérées comme les plus spécifiques de la pathologie bien que tous les individus atteints n'en aient pas forcément. Pour exemple, les patients mutés au niveau du gène *SOD1* porteurs de la mutation A4V ou H46R n'en auraient pas (Kato, 2007; Ohi et al., 2004; Shibata et al., 1996).

Forme de SLA	NF	Ub	P62	CysC	SOD1	TDP-43	FUS	DPR/Foci
<i>SOD1</i>	+	+	+	+/-	+			
<i>TARDBP</i>	+	+	+	+		+	+/-	
<i>FUS</i>	+	+	+	+			+	
<i>C9ORF72</i>	+	+	+	+		+		+
<i>SALS</i>	+	+	+	+		+	+/-	

Tableau 2 | Variabilité des marqueurs neuropathologiques associés à chaque mutation. Les accumulations de neurofilaments (NFs), les marquages Ubiquitines (Ub), p62 et Cystatine C (CysC) seraient retrouvés dans tous les patients que ce soit des patients ayant une forme familiale ou sporadique. Les agrégats SOD1 seraient spécifiques des patients porteurs d'une mutation au niveau du gène *SOD1*. La protéine TDP-43, codée par le gène *TARDBP* serait agrégée dans la plupart des MNS SLA, excepté pour les patients mutés au niveau du gène *SOD1* et *FUS*. Les agrégats de la protéine FUS ne sont pas retrouvés dans les patients mutés au niveau du gène *SOD1* ou porteurs des expansions G4C2. Les MNS de patients porteurs des expansions au niveau du gène *C9ORF72* contiendraient spécifiquement des agrégats de protéines à motifs dipeptidiques (DPR) et des *foci* d'ARN (Blokhuis et al. 2013, Saberi et al. 2015, Ravits et al. 2013, Kato et al. 2007). (+) pour présence d'agrégats ou d'accumulation, (+/-) pour présence controversée ou variable.

La cystatine C (CysC) est un inhibiteur très puissant qui va permettre, entre autres, de neutraliser l'activité des cathepsines (protéases lysosomales) régulant ainsi la protéolyse de la voie endo-lysosomale. Elle joue un rôle essentiel dans la balance du métabolisme protéique lors du vieillissement (Mathews and Levy, 2016). Impliquée dans les voies neurodégénératives ou neuroprotectrices (Mathews and Levy, 2016), elle est diminuée dans le LCR d'individus atteints de SLA et corrèlerait avec la survie de certains patients (Blasco et al., 2014; Pasinetti et al., 2006; Ryberg et al., 2010).

La transferrine est une protéine de liaison au fer qui joue un rôle dans le transport de ce dernier aux différents tissus (Mizuno et al., 2006). Une dérégulation du fer provoque du stress oxydatif, impliqué dans les mécanismes de mort cellulaire des maladies neurodégénératives (Ashraf et al., 2018; Guiney et al., 2017; Li and Reichmann, 2016). De récentes études ont mis en avant une dérégulation du métabolisme ferrique chez des individus atteints de SLA (Gajowiak et al., 2016; Veyrat-Durebex et al., 2014). Cette perturbation est liée à une diminution de survie des patients (Nadjar et al., 2012). Un essai clinique de phase III au Déferiprone (NCT03293069), médicament indiqué dans le traitement de la surcharge en fer est en cours (Moreau et al., 2018). Le fer serait

d'ailleurs un potentiel biomarqueur de la pathologie (Ignjatović et al., 2013; Sheelakumari et al., 2016; Zheng et al., 2017)(cf. [p.26](#)).

(ii) Les inclusions en écheveaux

Les inclusions en écheveaux ne sont pas visualisables avec un marquage classique Hématoxyline-Eosine (Sabeti et al., 2015). Ce sont des structures filamenteuses qui peuvent prendre une forme plus sphérique (Leigh et al., 1988) marquées par l'Ubiquitine, p62 et majoritairement par TDP-43 (Arai et al., 2006; Leigh et al., 1988; Lowe et al., 1988; Neumann et al., 2006; Ravits et al., 2013).

Comme nous l'avons vu précédemment, TDP-43 est une protéine à localisation majoritairement nucléaire impliquée dans le métabolisme des ARNs. De façon pathologique, on peut la retrouver au niveau cytoplasmique, ubiquitinylée, anormalement clivée et hyperphosphorylée (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Des inclusions de TDP-43 ont été retrouvées chez des patients SALS et la majorité des FALS, excepté pour les individus mutés au niveau du gène *FUS* et *SOD1*. Chez les patients mutés *FUS*, ces inclusions, qui ne contiennent pas TDP-43, renferment la protéine FUS (Blokhuis et al., 2013; Deng et al., 2010; Maekawa et al., 2009; Sabeti et al., 2015) (**Tableau 2**).

Protéine de liaison à l'ubiquitine, p62 est codée par le gène *SQSTM1* qui peut entraîner la SLA une fois muté (Fecto et al., 2011; Teysou et al., 2013). L'ubiquitine marque les protéines devant être éliminées par le protéasome (Dantuma and Bott, 2014). Les agrégats d'ubiquitine sont une caractéristique classique des maladies neurodégénératives. Ils sont retrouvés chez tous les patients avec une SLA (Blokhuis et al., 2013; Sabeti et al., 2015) (**Tableau 2 et Fig. 5, p.24**). Il a été suggéré que l'ubiquitinylation était une étape précoce considérant que plus d'agrégats ubiquitinylés pouvaient être retrouvés dans les formes de SLA agressives (Schiffer et al., 1991).

(iii) Les accumulations des protéines du cytosquelette

La polarité, la morphologie et l'intégrité des axones sont permises par le cytosquelette neuronal composé de microtubules (MTs), de microfilaments d'actines et de NFs (Kevenaar and Hoogenraad, 2015) (**Fig. 6**). Les NFs sont les principaux composants des axones. Ils permettent notamment de maintenir le calibre axonal (Yuan et al., 2017). Les MTs et les filaments d'actine sont des structures dynamiques qui permettent aux prolongements de se spécifier, de croître, de s'adapter et fournissent aux molécules motrices les routes pour le transport de protéines, vésicules et organites (Kevenaar and Hoogenraad, 2015).

Les accumulations de protéines du cytosquelette sont fréquemment observées dans les tissus *post-mortem* de patients SLA. L'accumulation de pNFs, de mitochondries et de lysosomes ainsi que la présence de sphéroïdes axonaux contenant des protéines du cytosquelette (MTs et NFs) et des organelles (lysosomes, mitochondries) pourraient être le reflet d'une altération du transport axonal (De Vos and Hafezparast, 2017).

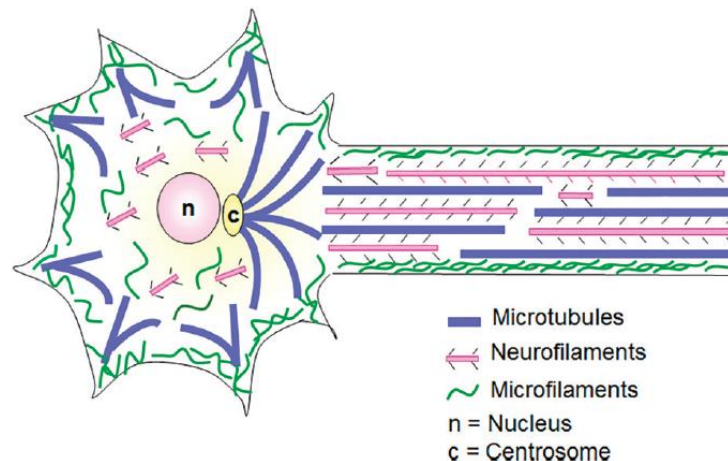


Figure 6 | Distribution des constituants du cytosquelette neuronal. Le cytosquelette est composé des microfilaments d'actine, de MTs et de filaments intermédiaires (NFs). Les MTs sont nucléés au centrosome (c) et délivrés aux prolongements dendritiques et axonal. Les NFs sont très abondants et leurs phosphorylations permet de réguler leur éloignement et ainsi moduler le calibre axonal. Les microfilaments sont retrouvés dans toute la cellule, majoritairement près de la membrane plasmique (Pessoa-Pureur et al. 2017, réimprimée avec la permission de *InTech* via *CC, License 3.0*).

LES NEUROFILAMENTS

Ils sont formés par la polymérisation de 4 sous-unités : les NFs légers ou « light » (NF-L), les NFs lourds ou « heavy » (NF-H), NFs médians ou « medium » (NF-M) et l' α -internexine ou la périphérine localisées respectivement dans le SNC ou le SNP (Yuan et al., 2006, 2017) (**Fig. 7**).

Les NFs sont essentiels à la mise en place du calibre axonal et par extension à la vitesse de conduction des axones myélinisés (Križ et al., 2000a; Yuan et al., 2017). Au contraire des axones de souris dépourvues de NF-L ou NF-M dont le calibre axonal et la vitesse sont réduits, le calibre des axones de souris dépourvues de NF-H n'est pas modifié, malgré une diminution de conduction expliquée par des perturbations de courants ioniques. Ces résultats ont suggéré que les NFs pourraient aussi moduler la fonction des canaux à la membrane (Križ et al., 2000b, 2000a). Entre autres ils seraient d'importants modulateurs synaptiques et réguleraient l'organisation de multiples organites comme les mitochondries (Schwarz and Leube, 2016), le réticulum endoplasmique (RE) (Rao et al., 2011) ou les endosomes et lysosomes (Styers et al., 2004; Yuan et al., 2017).

Les NF-M et NF-H peuvent être phosphorylés de façon *phénoménale* au niveau de leur terminaison carboxylée (Snider and Omary, 2014). Cette phosphorylation est de plus en plus importante vers la partie distale de l'axone et est influencée par les voies de signalisation déclenchées par le stress, les neurotransmetteurs ou les facteurs de croissance (Holmgren et al., 2012). Cette hyperphosphorylation jouerait notamment un rôle dans la régulation du calibre, de la stabilité et du transport axonal (Shea et al., 2003; Snider and Omary, 2014).

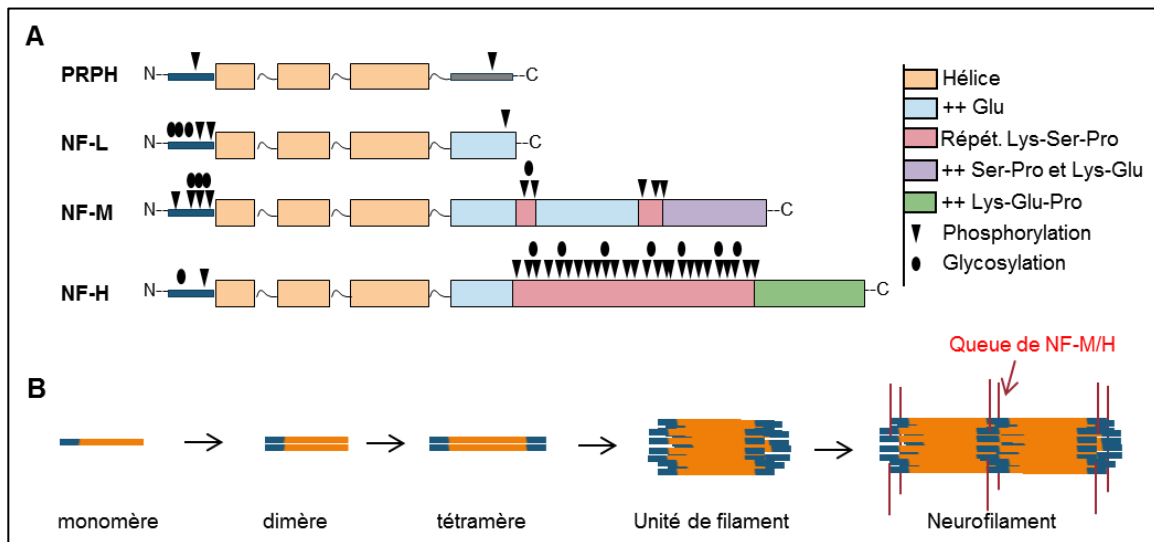


Figure 7 | Structure et assemblage des NFs périphériques et modifications post-transcriptionnelles. A) Les NFs sont formés par différentes sous-unités : la périphérine (PRPH), les NFs légers (NF-L), médians (NF-M), et lourds (NF-H). Tous les NFs ont une structure tripartite : (i) une tête courte variable en terminaison aminée (N) contenant des sites de glycosylation ou de phosphorylation, (ii) une région centrale en hélice (orange) commune à tous les NFs ; hydrophobe, elle permet de stabiliser la formation des dimères, et (iii) une queue en terminaison carboxyle (C), sensiblement variable entre les sous-unités qui détermine leur différence de taille. La PRPH a une queue très courte qui contient uniquement un site de phosphorylation. Les NF-L ont un seul domaine après les hélices, riche en acide glutamique. NF-M et H possèdent ce domaine mais ont des queues beaucoup plus longues avec des domaines de répétitions Lysine-Sérine-Proline hautement phosphorylables. Les NF-M finissent par un domaine riche en Sérine et Proline quant aux NF-H ils finissent par un domaine riche en Lysine Acide Glutamique et Proline. La phosphorylation des têtes évite celle de la queue à l'intérieur du soma. Celles des NF-L et NF-M altèrent les interactions avec d'autres protéines et influencent la croissance axonale. Les terminaisons carboxyterminales des NFs se phosphorylent en entrant dans l'axone et le long de leur transport axonal. L'état de phosphorylation des NFs augmente proximo-distalement le long de l'axone. **B)** Les sous-unités interagissent les unes avec les autres pour former des hétéropolymères avec la sous-unité NF-L. Les NFs se forment d'abord par l'assemblage de deux dimères en tétramères, puis 8 tétramères forment une unité de NFs qui formeront des filaments en s'associant par les extrémités de bout en bout (D'après Yuan et al. 2017).

Les perturbations des NFs ne sont pas spécifiques de la SLA. De façon normale, on les retrouve hyperphosphorylés dans les tissus de sujets âgés (Gou et al., 1995) mais elles sont plus importantes chez des individus atteints de SLA ou d'autres pathologies neurodégénératives (Braissant, 2007). Des inclusions de NFs peuvent être retrouvées dans les corps de Bunina (Kato, 2007) et près des inclusions en écheveaux dans la zone pré-axonale (Blokhuis et al., 2013). D'importants renflements neurofilamenteux sont aussi présents au niveau de la corne antérieure

de la moelle, dans le soma et dans la région proximale de l'axone (Carpenter, 1968; Mendonça et al., 2005; Sasaki et al., 1989). Alors que les NFs ne sont pas phosphorylés au niveau du soma et des dendrites, il peut y avoir une hyper-phosphorylation somatique chez les individus atteints de SLA (Manetto et al., 1988; Xiao et al., 2006a). Comme mentionné précédemment, les NF-L et les NF-H sont de plus en plus étudiés en tant que biomarqueurs diagnostics ou pronostics de la SLA. Actuellement les données suggèrent qu'ils pourraient être utilisés pour diagnostiquer des patients dont une SLA est suspectée (Schaepdryver et al., 2017) (cf. [p.26](#)).

L'expression de la périphérine est augmentée en cas de lésion neuronale (Zhao and Liem, 2016). Son accumulation dans les corps de Bunina a été identifiée chez des patients SALS et des patients FALS mutés au niveau du gène *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72* mais pas ceux mutés au niveau du gène *SOD1* (Ravits et al., 2013). La périphérine est aussi retrouvée dans un autre type d'inclusions denses appelées « *lewy-like* » (He and Hays, 2004). Ces dernières, ubiquitinylées, sont retrouvées dans les neurones de patients SALS et de patients mutés au niveau du gène *SOD1*. Elles renferment la protéine *SOD1* (Shibata et al., 1994, 1996).

LA PROTEINE TAU

La protéine Tau, importante pour l'assemblée et le maintien des MTs, s'agrège lors du vieillissement (Yang et al., 2005). Elle est surtout connue pour son rôle dans la maladie d'Alzheimer (Gao et al., 2018). Son agrégation a été mise en évidence dans certains tissus *post-mortem* de patients SLA avec des défauts cognitifs (Martinaud et al., 2005; Strong et al., 2006; Yang et al., 2003).

L'ACTINE

L'actine est le principal composant des microfilaments. Les microfilaments d'actine sont impliqués dans divers mécanismes tels que la neurogénèse, la distribution des protéines cytoplasmiques, la mobilité des vésicules synaptiques ou la stabilité synaptique (Hensel and Claus, 2018). L'agrégation d'actine a été peu décrite chez les individus SLA. L'actine est le composé principal des *corps d'Hirano*, observables préférentiellement au niveau de l'hippocampe lors d'un vieillissement normal et dans les neurones de certains individus atteints de SLA ou de la maladie d'Alzheimer. Ce sont des corps éosinophiles qui contiennent entre autres Tau et des NF-M (Galloway et al., 1987; Hirano, 1994).

(iv) Les foci et les peptides RANs

Les patients porteurs d'expansions d'hexanucléotides G4C2 au niveau du gène *C9ORF72* possèdent des inclusions spécifiques provoquées par la transcription bidirectionnelle de la

répétition qui produit des ARNs sens et anti-sens. Ces derniers sont traduits sans la nécessité d'un site d'initiation (Zu et al., 2011). Ils produisent des protéines à motifs dipeptidiques (DPR) anormales sens et non-sens qui s'accumulent dans le cytoplasme (Ash et al., 2013; Mori et al., 2013; Zu et al., 2013) (**Fig. 8 and 9**). Les ARNs délétères s'accumulent aussi et forment des « *foci* » (**Fig. 8 and 9**) retrouvés dans le cortex frontal et la moelle épinière des patients (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Gitler and Tsuiji, 2016; Ravits et al., 2013).

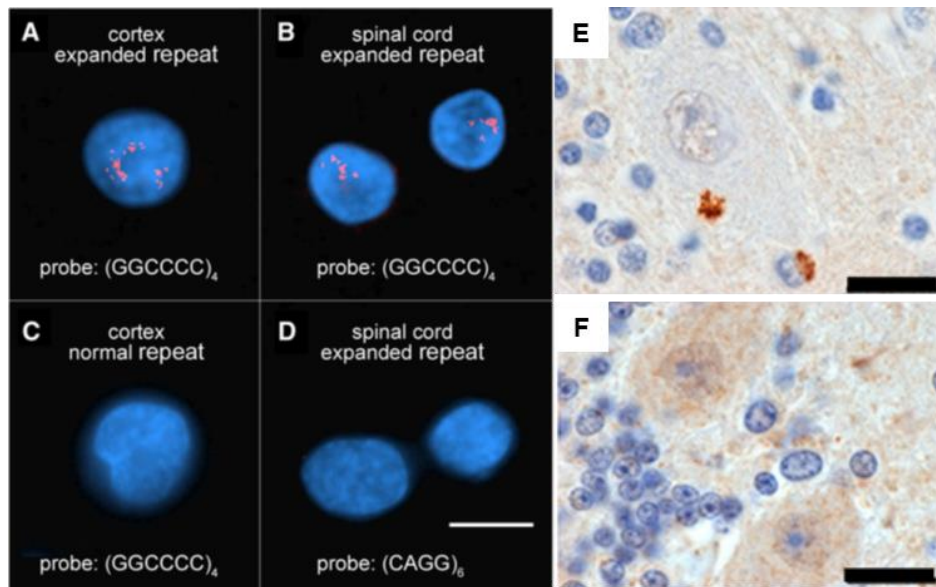


Figure 8 | ARNs *foci* et accumulation de protéines dipeptidiques dans les tissus de patients porteurs d'expansions au niveau du gène *C9ORF72*. A-D) Les expansions de répétitions G4C2 forment des *foci* nucléaires dans le cortex frontal moteur et la moelle épinière des patients (A, B) qui sont absents dans les tissus d'individus contrôles (C, D) E-F) Agrégations de protéines dipeptidiques (E) dans le cerebellum de patients mutés au niveau du gène *C9ORF72*, absents (F) chez des individus dépourvus de ces expansions. Echelle : 10 μ m (A, C), 20 μ m (B- F). (D'après DeJesus Hernandez 2011, Ash et al 2013). Réimprimée avec la permission de *Neuron* via le *Copyright Clearance Center* Licence n° 4400130478676 et 4400130662283.

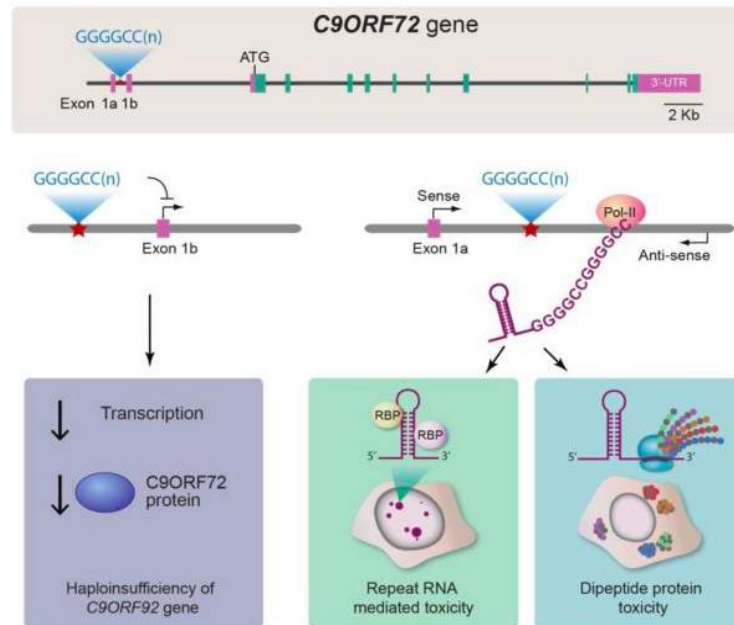


Figure 9 | Trois hypothèses mécanistiques de la pathogénie des expansions au niveau du gène *C9ORF72*. Haut) Le gène *C9ORF72* possède des répétitions d'hexanucléotides G4C2 dans une région non codante. Ces nombreuses répétitions sont la cause de DFT et/ou SLA. Actuellement 3 hypothèses expliqueraient pourquoi elles seraient pathogènes. **Bas gauche)** Les répétitions G4C2 causeraient une diminution de l'expression du gène, provoquant une diminution de protéine et une perte de fonction de *C9ORF72*. **Bas centre)** Les ARNs sont produits dans les deux sens de transcription, provoquant l'accumulation nucléaire ou cytoplasmique d'ARNs *foci* G4C2 et G2C4 (GGCCCC) ce qui provoquerait la séquestration des protéines de liaisons à l'ARN (dont des facteurs d'épissage), entraînant alors des défauts d'épissage. **Bas droite)** Les ARNs sens et anti-sens sont les substrats d'une traduction non classique qui générerait des protéines à motif dipeptidique (DPR) qui s'accumuleraient et entraîneraient une toxicité (Gitler and Tsuiji, 2016) Réimprimée avec la permission de *Brain Res* via *CC-NC-ND, License 4.0*.

Pour conclure, bien que l'analyse des tissus *post-mortem* ne représente que le stade final de la pathologie, elle donne des indices quant aux mécanismes impliqués dans la pathogénicité de la SLA, tels que la perturbation du transport axonal mis en évidence par la perturbation du cytosquelette, ou la dérégulation de l'homéostasie protéique et du métabolisme des ARNs mis en avant par la présence d'agrégats contenant des protéines spécifiques au maintien et à la régulation de ces phénomènes. En outre, plusieurs protéines, codantes pour des gènes mutés ou des variants à risque, sont retrouvées dans ces agrégats : SOD1, TDP43, FUS, p62 ou NF-H (Al-Chalabi et al., 2012b). On peut donc penser que la découverte de nouveaux composés de ces inclusions pourra amener à la découverte de nouveaux gènes impliqués dans la SLA, comme cela a été le cas pour le gène *TARDBP* (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Enfin, à la différence des corps de Bunina, une grande quantité d'inclusions en écheveaux serait associée à une augmentation de la mort cellulaire, majoritairement au niveau de la moelle épinière (Welsem et al., 2002). Cela suggère

que ces deux types d'inclusions pourraient refléter deux phénomènes différents dans la cascade des mécanismes provoquant la pathologie.

CHAPITRE 2 : LES MECANISMES INTRINSEQUES AUX MOTONEURONES AU TRAVERS DES ANIMAUX MODELES DE SLA

Les découvertes génétiques ont rendu possible le développement d'animaux modèles pour étudier l'évolution de la SLA de certaines formes familiales. S'il est vrai que chaque modèle a ses avantages et ses limitations, ils sont indispensables à la compréhension des processus impliqués et de leur imbrication mutuelle. Le modèle murin est le plus étudié avec plus de 4600 publications, surpassant de loin les autres modèles utilisés qui tournent autour de 70 à 200 publications (**Tableau 3**)(Damme et al., 2017).

	Levure	C. Elegans	Drosophile	Poisson zèbre	Modèle murin	Neurones dérivés d'humains
Homologie du génome avec l'humain	30%	35%	75%	>90%	100%	100%
Conservation des protéines	26%	35%	40%	75%	85%	100%
Publication concernant la SLA	~80	~73	~194	~68	>4600	~153

Tableau 3 | Les différents modèles pour étudier la SLA. La levure, C. Elegans, la drosophile, le poisson zèbre, le modèle murin et les neurones humains dérivés d'iPSC ou directement induits permettent d'étudier les mécanismes impliqués dans la SLA. Outre leur faible coût et leur courte durée de vie, les modèles simplifiés comme la levure et les petits animaux modèles comme le nématode C.Elegans, la drosophile ou le poisson zèbre ont l'avantage de permettre un criblage génétique et un criblage de potentielles molécules thérapeutiques que le modèle murin ne permet pas. L'avantage de ce dernier est qu'il partage 100% des gènes avec l'homme et que près de 80% des protéines sont conservées ce qui est d'autant plus pertinent pour tester des molécules thérapeutiques. Bien que le coût pour générer des neurones humains soit important, ce modèle a l'avantage de partager le génome et les protéines humaines directement de n'importe quel sujet sain ou malade permettant de modéliser des formes familiales et sporadiques où aucune cause génétique n'est identifiée (Van Damme et al. 2017).

I. LES SOURIS MODELES DE SLA

Il existe plusieurs modèles de souris de la SLA (**Tableau 4 au verso**). La souris porteuse d'une surexpression du gène humain muté *SOD1^{G93A}*, est jusqu'à présent le modèle le plus étudié et la majorité des découvertes mécanistiques le lui doivent (Gurney et al., 1994; Van Damme et al., 2017). Ce modèle récapitule la plupart des signes cliniques et neuropathologiques des patients SLA. La force musculaire diminue vers le premier mois de vie de la souris qui se paralyse progressivement et décède de façon précoce. Neuropathologiquement, les MNs sont hyperexcitables très précocement et montrent des signes de souffrance axonale avant la phase

symptomatique. A leur décès, les souris ont perdues 50% de leurs MNs. La protéine SOD1 est agrégée dans les MNs restants et il n'y a pas d'agrégats TDP-43, tout comme dans les tissus *post-mortem* de patients mutés au niveau du gène *SOD1* (Blokhuis et al., 2013; Vinsant et al., 2013a)(Tableau 2 et 4).

Mutations	Initiation (mois)	Survie (mois)	Perte des MNs+ Paralyse	Inclusions décrites	Référence	
SOD1	G93A	3	5	oui	SOD1, NFs, LBL, Ub	(Gurney et al., 1994)
	G37R	4-6	6-8	oui	nd	(Wong et al., 1995)
	H46R	5	6	oui	SOD1, Ub, pNFs	(Sasaki et al., 2007)
TARDBP	A315T	3-4	5,5	oui	Ub	(Wegorzewsk a et al., 2009)
	G348C	10	normale	non	TDP43, Ub, PRPH, NFs	(Swarup et al., 2011)
	M337V	10	normale	oui	no	(Arnold et al., 2013)
FUS	R521C	1-2	4-6	oui	Fus (<10%)	(Qiu et al., 2014)
C9ORF72	G4C2⁶⁶	6	nd	nd	Foci d'ARNs, pTDP43, DPR	(Chew et al., 2015)
	G4C2⁵⁰⁰	16	16	oui	Foci d'ARNs, DPR, TDP43	(Peters et al., 2015)

Tableau 4 | Phénotypes de souris SLA en fonction du gène muté. Une souris vit environ 18 à 24 mois (Picher-Martel 2016). NFs , Neurofilaments ; DPR, Protéines à motif dipeptidique ; LBL, Lewy Body Like ; Ub, Ubiquitine ;PRPH, périphérine ; no, non observé ; nd, non décrit.

II. L'INITIATION DE LA SLA EST INTRINSEQUE AUX MOTONEURONES

Grâce aux comparaisons entre ce modèle et les modèles murins où la protéine SOD1 mutée est spécifiquement diminuée ou uniquement présente dans un type cellulaire particulier, il a pu être mis en évidence l'importance de chaque type cellulaire dans l'initiation et la progression de la pathologie.

L'expression spécifique de la protéine SOD1 mutée dans les neurones (Jaarsma et al., 2008) ou les MNs (Boillée et al., 2006) est suffisante pour induire la dégénérescence des MNs. En outre, en diminuant l'expression de la protéine SOD1^{G37R} uniquement dans les MNs, *Boillée et al.* ont pu prolonger la vie des souris d'un mois en retardant l'initiation de la SLA ainsi que sa progression. Ainsi, ces résultats ont suggéré que la pathologie débutait d'abord dans les MNs (Boillée et al., 2006).

Dans les souris SOD1^{G93A}, *Kang et al.* ont observé une perturbation de la myéline avant l'initiation de la pathologie. En retirant le gène *SOD1* muté uniquement des progéniteurs d'oligodendrocytes, ils ont pu augmenter la survie des souris en repoussant les premiers signes pathologiques (Kang et al., 2013). De plus, une étude *in vitro* a démontré que la diminution de la protéine SOD1 mutée dans les oligodendrocytes différenciés n'améliorait pas la survie des MNs, à la différence du retrait de la protéine mutée dans les progéniteurs (Ferraiuolo et al., 2016). Ces résultats suggèrent que les oligodendrocytes, essentiels à la myélinisation et au support trophique des neurones pourraient jouer un rôle dans la vulnérabilité des MNs à la SLA.

D'un autre côté, *Boillée et al.* ont montré que la diminution de la protéine mutée SOD1^{G37R} dans les microglies permettait d'améliorer la survie des souris. Sans modifier son apparition, cela ralentit sa progression de près de deux mois (Boillée et al., 2006). De la même façon, il a été montré qu'une diminution de la protéine mutée SOD1^{G37R} dans les astrocytes n'affectait pas le début de la pathologie mais ralentissait sa progression d'une cinquantaine de jours (Yamanaka et al., 2008).

En conclusion, ces résultats ont suggéré que la SLA débutait dans les MNs et que les cellules environnantes jouaient un rôle déterminant dans la vitesse de progression de la SLA, en tout cas dans le modèle murin muté au niveau du gène *SOD1*.

Le schéma au verso résume l'implication des différents gènes et mécanismes intrinsèques et extrinsèques associés à la SLA (**Fig. 10**). Les gènes et les mécanismes intrinsèques seront présentés plus en détails dans la partie suivante.

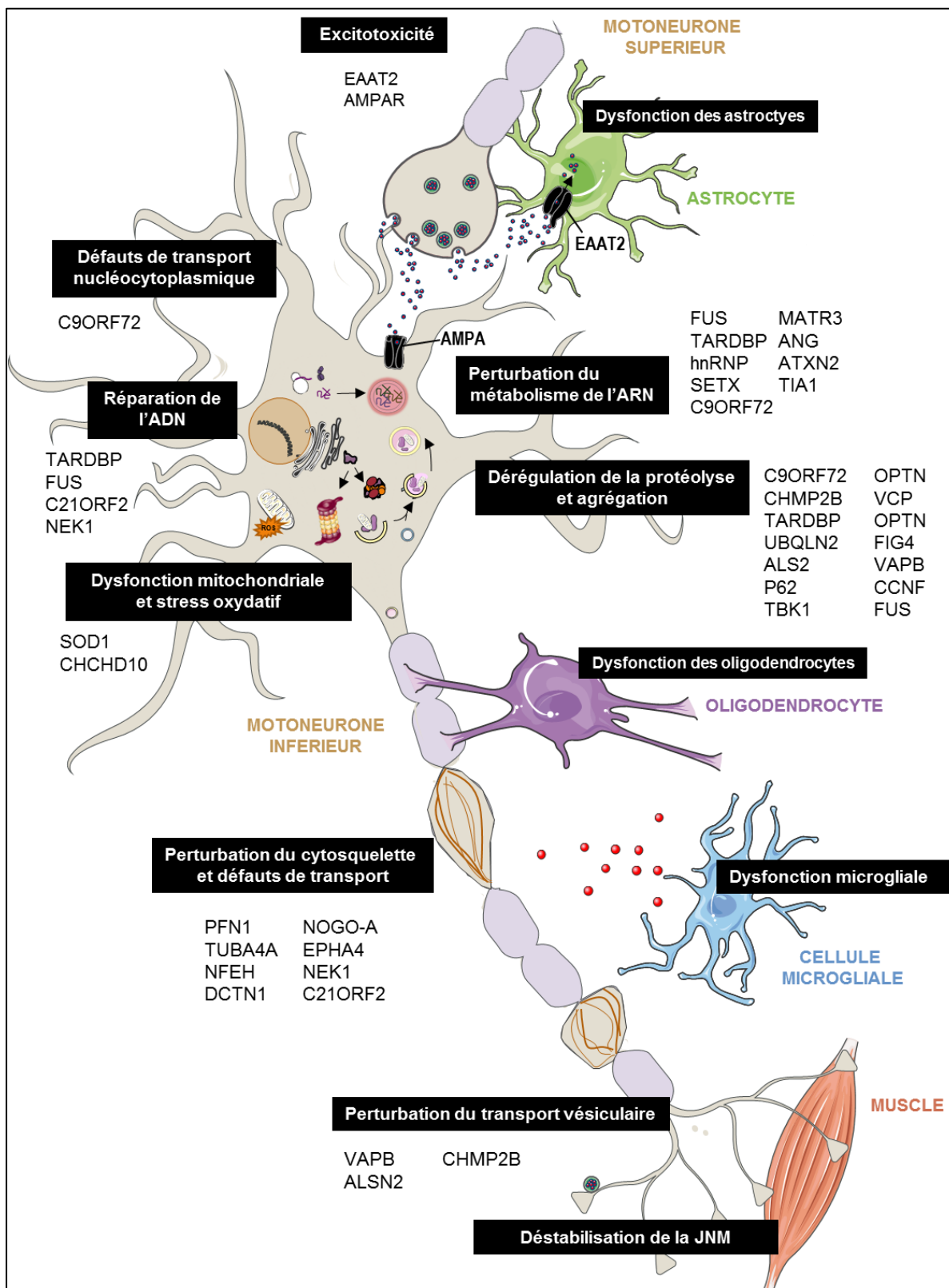


Figure 10 | Vue d'ensemble : Implication des différents gènes et mécanismes associés à la SLM.
Inspirée de Van Damme et al. 2017 et réalisée à partir d'images Servier Medical Art via la licence CC 3.0.

III. LES MECANISMES INTRINSEQUES AUX MOTONEURONES

A ce jour, de nombreux gènes ont été associés à la SLA. Puisque la SLA est dans la plupart des cas lié à des mutations autosomiques dominantes, il est possible que le gène muté code pour une protéine dont la fonction est altérée ou modifiée. La fonction supposée de ces gènes a ainsi conduit à la déduction de plusieurs mécanismes pathologiques.

Le tableau suivant présente une liste non exhaustive des gènes, classés selon ce qui pourrait être leur première conséquence pathologique (**Tableau 5**).

Gène	Fonction supposée de la protéine	Transmission	Référence
Stress oxydatif et dysfonction mitochondriale			
<i>SOD1</i>	Métabolisme des radicaux superoxydes	AD, AR	(Rosen et al., 1993)
<i>CHCHD10</i>	Stabilité du génome mitochondrial et des crêtes mitochondriales	AD	(Bannwarth et al., 2014; Johnson et al., 2014a; MinE ALS, 2018)
Dysfonction de la dégradation protéique et de l'autophagie			
<i>CCNF</i>	Ubiquitylation pour la dégradation au protéasome	AD	(Williams et al., 2016)
<i>VCP</i>	Chaperonne, autophagie, Trafic vésiculaire	AD	(Johnson et al., 2010)
<i>SQSTM1</i>	Ubiquitylation des protéines pour être dégradées dans le protéasome et autophagie	AD	(Fecto et al., 2011)
<i>UBQLN2</i>	Ubiquitylation des protéines pour être dégradées dans le protéasome	AD, Lié à l'X	(Deng et al., 2011)
<i>TBK1</i>	Kinase, Autophagie et neuroinflammation	AD	(Freischmidt et al., 2015)
<i>OPTN</i>	Régule voie NFκB, trafic vésiculaire, exocytose, autophagie, maintenance Golgi	AD, AR	(Maruyama et al., 2010)
<i>CHMP2B</i>	Complexe de l'endosome, trie protéines des corps multivésiculaires et de leur autophagie	AD	(Parkinson et al., 2006)
<i>FIG4</i>	Phosphatase, Fonction lysosomale, trafic vésiculaire des endosomes	AD, AR	(Chow et al., 2009)
Métabolisme de l'ARN			
<i>C9ORF72</i>	Transcription, régulation épissage ARNm et GTPases, trafic membranaire, inflammation, autophagie	AD	(DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011)
<i>TARDBP</i>	Protéine de liaison à l'ADN/ARN, métabolisme de l'ARN, maintenance de l'ADN, domaine <i>prion-like</i>	AD, AR	(Sreedharan et al., 2008)
<i>FUS/TLN1</i>	Protéine de liaison à l'ARN, métabolisme de l'ARN, maintenance de l'ADN, domaine <i>prion-like</i>	AD, A,	(Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009)
<i>SETX</i>	ADN/ARN hélicase, métabolisme ARN, ADN	AD	(Chance et al., 1998)
<i>MATR3</i>	Protéine de liaison à l'ADN/ARN, interagit avec TDP43	AD	(Johnson et al., 2014b)

ANG	RNase, stimule angiogenèse	AD	(Green et al., 2006)
ATXN2	Métabolisme de l'ARN, interagirait avec RE et TDP43	AD	(Elden et al., 2010)
hnRNPA2B1 hnRNPA1	Protéines de liaison à l'ARN, régule le métabolisme et le transport des ARNs	AD	(Kim et al., 2013)
TIA1	Granules de stress	AD	(Mackenzie et al., 2017; Spek et al., 2018)
Excitotoxicité			
DAO	D-Amino-acid oxidase, Fonction récepteur NMDA	AD	(Mitchell et al., 2010)
Perturbation du cytosquelette et du transport cellulaire			
NEFH	Sous unité des NFs, Transport axonal	AD	(Al-Chalabi et al., 1999)
DCTN1	Dynactine, Transport axonal lysosomes, endosomes	AD	(Puls et al., 2003)
VAPB	Trafic vésiculaire, Régulation Golgi/RE	AD	(Nishimura et al., 2004)
PRPH	Sous unité des NFs périphériques	AD	(Corrado et al., 2011; Leung et al., 2004)
SPG4	Protéine de séparation des microtubules	AD, AR	(Meyer et al., 2005)
PFN1	Polymérisation de l'actine	AD	(Fox et al., 2012)
TUBA4A	Composé majeur des MTs	AD	(Smith et al., 2014)
C21orf2	Organisation du cytosquelette, réparation de l'ADN	AD	(van Rheezen et al., 2016)
NEK1	Kinase, régulation cycle cellulaire, développement axonal	nd	(Brenner et al., 2016)
KIF5A	Kinésine, Transport de neurofilaments, VAPB	AD	(Brenner et al., 2018; Nicolas et al., 2018)
Mécanismes multiples			
ALS2	Régule GTPases, autophagosome, trafic vésiculaire	AR	(Yang et al., 2001)
SPG11	Cytosquelette, transport axonal, trafic vésicules synaptiques, expression génique	AR	(Orlacchio et al., 2010)

Tableau 5 | Mécanismes pathologiques pouvant être associés aux gènes mutés. RE : Réticulum Endoplasmique AR, autosomique récessif ; AD, autosomique dominant ; nd, non déterminé. (Maurel et al. 2018 ; Ghasemi et al. 2018)

1. METABOLISME PROTEIQUE

La dérégulation de l'homéostasie protéique peut provoquer l'accumulation d'agrégats cytoplasmiques et la mort cellulaire (**Fig. 11**) (Webster et al., 2017). Plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des protéines, et notamment dans l'autophagie, sont une cause génétique de SLA

(Tableau 5). Parmi eux, l'ubiquiline 2, l'optineurine et p62 sont retrouvées dans les tissus *post-mortem* de patients SLA. L'optineurine peut d'ailleurs colocaliser avec FUS dans les inclusions basophiles de patients mutés au niveau du gène *FUS* (Fecto et al., 2011; Maruyama, 2012).

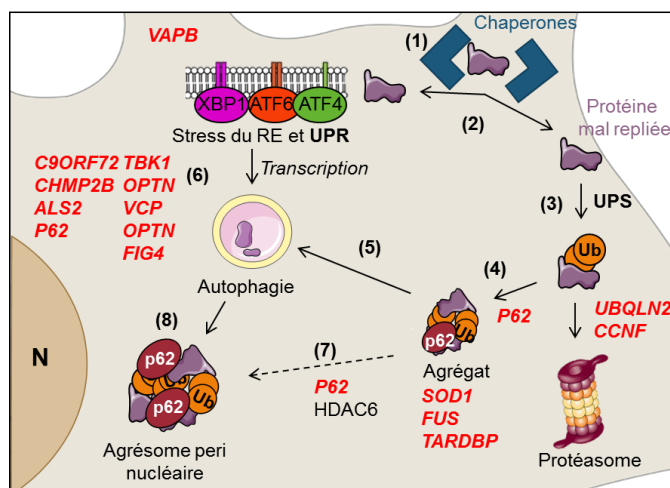


Figure 11 | Homéostasie protéique. (1) Les protéines mal conformées sont prises en charge par des molécules « chaperonnes » pour les replier, comme HSP70. La conformation des protéines s'effectue dans le cytosol et le réticulum endoplasmique (RE). (2) Lorsque les protéines mal repliées dans le cytosol ou le RE sont trop nombreuses, la réponse UPS (*Ubiquitin Proteasome Response*) ou la réponse UPR (*Unfold Proteine Response*) se déclenche respectivement. (3) Avec la réaction UPS, les protéines sont ubiquitinylées (UBQLN2, Ub) et envoyées vers le protéasome pour être dégradées. (4) Si le système est débordé, des agrégats de protéines ubiquitinylées se forment. (5) p62 les reconnaît et enclenche la voie de dégradation via l'autophagie et les lysosomes. (6) La réaction UPR entraîne la transcription de gènes associés à la dégradation et l'autophagie. (7) Les agrégats sont transportés via les MTs pour former des agrésomes. HDAC6 s'associe avec des complexes moteurs rétrogrades pour faciliter leur transport. (8) L'autophagie participe à l'élimination des agrésomes. En rouge, les gènes impliqués dans les différentes étapes de l'homéostasie protéique dont les mutations peuvent entraîner la SLA (Webster et al. 2017). N=noyau. Réalisée à partir d'images Servier Medical Art via la license CC 3.0.

Les protéines acquièrent leur conformation dans le cytosol et le RE. Lorsque les protéines ne sont pas bien formées et que les molécules chaperonnes tels que HSP70 ne suffisent plus, la réaction UPS (*Ubiquitin Proteasome Response*) s'enclenche. p62, codée par ***SQSTM1/p62*** reconnaît les protéines ubiquitinylées pour les adresser au protéasome (3) et enclenche la voie de dégradation via les lysosomes et l'autophagie (Garcia-Huerta et al., 2016; Senft and Ronai, 2015). Si le système est débordé, des agrégats de protéines ubiquitinylées se forment.

L'accumulation de protéines mal conformées, ou la surcharge du protéasome entraîne la formation de structures périnucléaires, appelées agrésomes (Johnston et al., 1998; Kopito, 2000). Leur formation requiert p62 ainsi que HDAC6, qui va transporter les protéines polyubiquitinylées via des protéines motrices le long des MTs pour qu'elles soient enfermées dans une « cage » de filaments intermédiaires constituant une réponse protectrice au stress entraîné par la dérégulation de l'homéostasie protéique (Matsumoto et al., 2018; Rodriguez-Gonzalez et al., 2008; Zhang et al., 2018).

OPTN (Maruyama et al., 2010) code pour l'Optineurine. Comme p62, l'Optineurine a la capacité de lier des « cargos » ubiquitinylés jusqu'à l'autophagosome via les MTs. Elle est notamment impliquée dans la dégradation des mitochondries et des agrégats protéiques via l'autophagie (Ying and Yue, 2016).

La phosphorylation de p62 et Optineurine par **TBK1** - dont le gène muté est aussi une cause de SLA (Freischmidt et al., 2015) - favorise la dégradation des mitochondries (Richter et al., 2016; Weidberg and Elazar, 2011).

VAPB module l'activité d'ATF6 (Gkogkas et al., 2008), un des gènes clés de la réponse UPR (*Unfold Protein Response*) déclenchée lorsque les protéines mal repliées dans le RE sont trop nombreuses. Elle entraîne la transcription de gènes associés à la dégradation (dont ATF6, PERK, et IRE1 via XBP1s). L'activation de PERK active notamment la transcription de gènes impliqués dans l'autophagie (Senft and Ronai, 2015). Dans les souris mutées SOD1^{G93A} le stress UPR est augmenté dès la première semaine après la naissance suggérant que c'est un événement précoce dans la pathologie (Atkin et al., 2008; Saxena et al., 2009). Les protéines PERK, ATF6 et IRE sont d'ailleurs surexprimées dans des tissus *post-mortem* de patients SALS (Atkin et al., 2008). Larroquette et al. ont montré que des marqueurs de stress du RE (PDI, BiP) et de l'autophagie (p62, LC3) étaient augmentés dans la souris VAPB^{P56S} (Larroquette et al., 2015).

Aussi, une étude chez la souris SOD1^{G93A} a montré que l'autophagie était dérégulée avant l'apparition des premiers symptômes. Son inhibition a accéléré la dénervation et a augmenté la survie des souris (Rudnick et al., 2017). En outre, Mitsui et al. ont montré que la surexpression de **SQSTM1/p62** dans un modèle de souris SOD1 accélérerait l'apparition des premiers symptômes (Mitsui et al., 2018).

2. METABOLISME DES ARNS

La découverte des mutations dans les gènes **TARDBP** et **FUS** a démontré l'importance des protéines de liaison à l'ARN (**Tableau 5, p.38**). Mutées, elles perdent leur localisation nucléaire et donc leur habilité à traiter les ARNs qu'elles ont à charge, tels que leur synthèse et leur dégradation et s'agrègent dans le noyau ou le cytoplasme (Kapeli et al., 2017). TDP-43 et FUS régulent l'épissage de multiples ARNs mais aussi les niveaux d'expression de protéines essentielles à la fonction neuronale (Lagier-Tourenne et al., 2012). Ainsi un métabolisme anormal des ARNs peut conduire à la production de protéines anormales (**Fig. 12**).

L'équipe de Don Cleveland a démontré que l'agrégation ou la perte de TDP-43 nucléaire ne serait pas nécessaire à la dégénérescence des MNs de souris mutées TDP43^{M337V} ou ^{Q331V}. En effet, dans les souris, les MNs dégénèrent malgré l'absence d'agrégats TDP-43 et l'absence de délocalisation

de celle-ci, suggérant que la perte des MNs serait plutôt liée à une altération de l'épissage à un stade précoce de la maladie (Arnold et al., 2013).

Parmi les cibles de TDP-43 se trouve notamment l'ARNm de NF-L qu'elle stabilise (Strong et al., 2007). La surexpression de la protéine mutée TDP-43^{G348C} pourrait provoquer l'accumulation de NF-M et NF-H ainsi que la diminution de la protéine NF-L dans la moelle épinière des souris transgéniques (Oberstadt 2018, Swarup 2011). *Gu et al.* ont montré que TDP-43 régula aussi l'épissage de *MAPT* codant pour Tau (Gu et al., 2017) dont la dérégulation peut être aussi une cause DFT (Hutton et al., 1998; Kar et al., 2005).

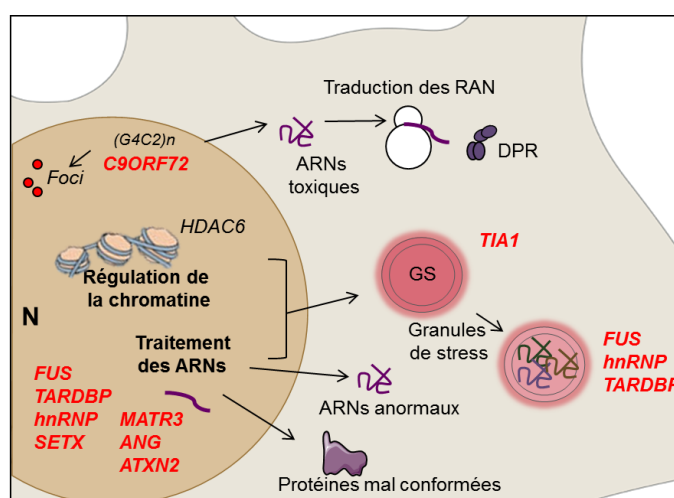


Figure 12 | Métabolisme des ARNs. Une perturbation des ARNs peut produire des protéines anormales et des ARNs toxiques. Une situation de stress peut induire la formation de granules de stress (GS) qui peuvent contenir des ARNs anormaux. La transcription des expansions G4C2 produit aussi des ARNs toxiques et la formation de *foci* nucléaires. Traduits, les ARNs issus des expansions produisent des protéines à motifs dipeptidiques appelées DPR. En rouge, les gènes impliqués dans les différentes étapes du métabolisme des ARNs dont les mutations peuvent entraîner la SLA. *Donnelly et al.* 2014. N=noyau. Réalisée à partir d'images Servier Medical Art via la license CC 3.0.

D'autre part, il a été montré que la perte de TDP-43 diminuait la synthèse d'HDAC6 (Fiesel et al., 2010). HDAC6 est une histone déacétylase. En plus de son rôle dans l'homéostasie protéique, elle est importante dans la régulation de la transcription. Elle serait essentielle à l'assemblage des granules de stress (Kwon et al., 2007) et promouvoir la dernière étape de l'autophagie. Dans le modèle de souris SOD1^{G93A}, l'expression d'HDAC6 est diminuée dès l'apparition des symptômes et sa surexpression améliore sa survie en favorisant la formation d'autolysosomes et la dégradation des agrégats de la protéine SOD1 (Chen et al., 2015). D'autant plus que la dérégulation de HDAC6 favorise l'accumulation d'agrégats toxiques cytoplasmiques puisqu'elle est nécessaire à la régulation de l'agrésome de SOD1 (Fiesel et al., 2010; Xia et al., 2015). Outre son implication dans la formation d'agrésomes et la réponse au stress associée aux protéines mal repliées, dont l'autophagie (Boyault and Khochbin, 2008), HDAC6 régule aussi la stabilité du cytosquelette et le

transport axonal dont l'importance et leur rôle dans la pathogénicité de la SLA seront évoqués dans la partie suivante (Boyault et al., 2007; Van Helleputte et al., 2014).

Quant à la protéine FUS, elle régule notamment les ARNs des sous-unités du récepteur glutamatergique AMPA, dont la sur-stimulation peut être excitotoxique (Udagawa et al., 2015; Vieira et al., 2010). Elle régule aussi l'ARNm des protéines SOD1, NF-L, M, et H, EAAT2 (transporteur du glutamate) ou encore d'Ubiquiline 2 et Tau (Lagier-Tourenne et al., 2012).

La découverte des expansions G4C2 dans le gène *C9ORF72* a appuyé l'hypothèse de la toxicité induite par une perturbation du métabolisme des ARNs (**Fig. 8, p.30**). Parce que les expansions G4C2 forment des structures qui facilitent les interactions ARN-ARN, l'agrégation des transcrits et la formation des *foci* nucléaires est favorisée (Haeusler et al., 2014; Reddy et al., 2013). L'agrégation des transcrits pourrait séquestrer des protéines de liaisons à l'ARN, dont des facteurs d'épissage, entraînant alors des défauts d'éditions des ARNs (Swinnen et al., 2018).

Les souris porteuses d'expansions (G4C2)⁶⁶ ont des inclusions de *foci* d'ARN, de protéines dipeptidiques et de TDP-43 phosphorylées en plus de la perte neuronale (Chew et al., 2015). L'administration d'un traitement ciblant les ARNs réduit les *foci* et les DPR tout en améliorant les capacités cognitives des souris (Jiang et al., 2016). Des modèles de drosophiles *C9ORF72* (G4C2)⁵⁸ ont permis de mettre en évidence que les expansions compromettent le transport nucléocytoplasmique ce qui provoque un défaut d'exportation des ARNs et leur rétention nucléaire. Le transport nucléocytoplasmique est vital et pourrait être une des causes de la dégénérescence des MNs (Freibaum et al., 2015; Mor et al., 2014).

D'autre part, en situation de stress, la transcription peut se bloquer et induire la formation très rapide de granules de stress par le biais de la protéine TIA-1 (Dewey et al., 2012; Li et al., 2013). Ces structures dynamiques agiraient en tant que « trieur » d'ARNs et détermineraient leur devenir (traduction, séquestration ou dégradation). En situation pathologique, ces granules peuvent perturber le métabolisme protéique et amplifier la formation d'inclusions cytoplasmiques (Dewey et al., 2012). Ces granules qui peuvent contenir des ARNs toxiques, peuvent aussi renfermer des facteurs de l'initiation transcriptionnelle, des sous-unités ribosomales et des protéines de liaisons à l'ARN tels que FUS, TDP43 ou hnRNPs (Geuens et al., 2016) qui sont des ribonucléoprotéines dont les mutations causent aussi une SLA (Bentmann et al., 2013; Li et al., 2013).

3. STRUCTURE AXONALE ET DESORGANISATION DU CYTOSQUELETTE

Chez les souris SOD1^{G93A} présymptomatiques plusieurs gènes codant pour des protéines liées au cytosquelette, dont *KIF5A* (Kinésine), *ANK2* (Ankyrin 2) ou *NFEM*, sont dérégulés suggérant que la perturbation du cytosquelette est un phénomène précoce lié à l'initiation de la pathologie (Maximino et al., 2014).

Le fait que plusieurs mutations ou variants à risque touchent des gènes codant pour des protéines du cytosquelette renforce le rôle de ce dernier dans la pathogénèse de la SLA (**Fig. 13 et Tableau 5**). La figure 12 illustre les protéines et les gènes de SLA impliqués dans le transport axonal et le cytosquelette.

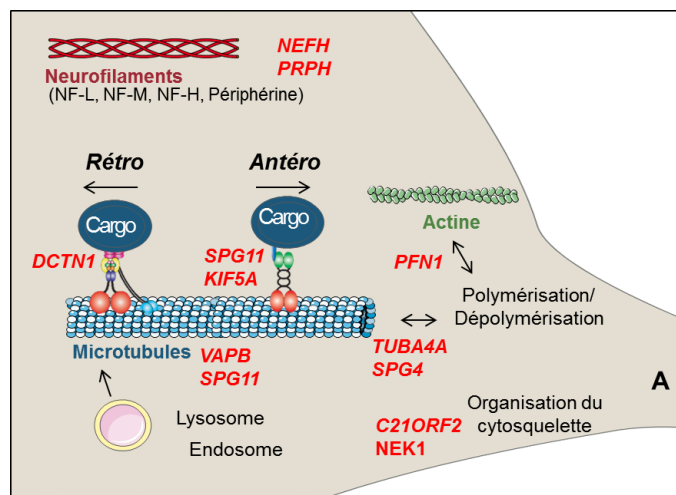


Figure 13 | Transport et cytosquelette. Les NFs (NF-L, NFM, NF-H et périphérine (PRPH)) participent à la régulation de l'activité synaptique et du calibre axonal. Le transport axonal des organelles et vésicules est indispensable aux MNs. Les transports rétrogrades (de l'axone vers le soma) et antérograde (du soma vers l'axone) sont médiés par des protéines motrices le long des microtubules : dynéines et kinésines respectivement. La dynactine (DCTN1) stabilise la liaison MTs/cargo/dynéine. La Kinésine 1 (KIF5A) peut transporter des NFs. FIG4 régule le transport rétrograde des endosomes, quant à la spatascine (SPG11) elle régule le transport antérograde. Les microtubules sont composés de tubulines (TUBA4A) qui se polymérisent et se dépolymérisent. SPG11 participe à la stabilité du cytosquelette. SPG4 participe à la séparation des microtubules. La profiline (PFN1) est impliquée dans la polymérisation de l'actine. C21ORF2 et NEK1 régulent l'organisation du cytosquelette. En rouge, les gènes associés au cytosquelette dont les mutations peuvent entraîner la SLA. De Vos et Hafezparast 2017. Réalisée à partir d'images Servier Medical Art via la license CC 3.0.

Plusieurs gènes causaux tels que **TUBA4A** qui code pour un composé majeur des MTs ou **KIF5A** codant une protéine motrice affectent directement le transport axonal. En effet, les MTs sont essentiels à la répartition des protéines tout au long des neurones puisque ce sont les routes qu'empruntent les mitochondries, les vésicules ou même les NFs pour se répartir tout le long de la cellule.

La profiline 1 (**PFN1**) (Fox et al., 2012) est cruciale pour la polymérisation de l'actine (Suetsugu et al., 1998), composée des microfilaments et interviendrait dans la régulation du réseau de MTs (Henty-Ridilla et al., 2017). L'Ubiquitine, p62 et PFN1 s'accumulent dans les MNs de souris PFN1^{C71G} qui développent une paralysie progressive. La dégénérescence des MNs de souris mutantes PFN1^{C71G} est préalable à l'agrégation de la protéine ce qui suggère que ces agrégats ne seraient pas la cause primaire de la dégénérescence des MNs (Yang et al., 2016).

Une mutation au niveau des filaments intermédiaires lourds (**NFEH**) (Figlewicz et al., 1994; Garcia et al., 2006) ou de la Périphérine (**PRPH**) (Corrado et al., 2011; Gros-Louis et al., 2004; Leung et al., 2004), confèrent un risque de développer la pathologie. Les NFs semblent être agrégés au niveau proximal de l'axone des MNs du modèle murin SOD1 et des patients SLA (Sasaki and Iwata, 1996a; Sasaki and Maruyama, 1992a; Sasaki et al., 1989, 2005a). Les NFs ont été suspectés depuis longtemps dans la pathogénicité de la SLA or la surexpression des NF-L ou des NF-H chez la souris SOD1^{G93A} prolonge leur survie (Kong and Xu, 2000). Plus que l'accumulation en elle-même, c'est le déséquilibre des différentes sous unités qui pourrait être délétère.

L'organisation du cytosquelette, formée par les MTs, les NFs et filaments d'actine est indispensable pour maintenir la structure axonale et la fonction des MNs. La souffrance axonale est d'ailleurs un des signes neuropathologiques majeurs de la SLA et les NFs sont parmi les biomarqueurs les plus prometteurs de la pathologie ([cf. p.26](#)).

4. METABOLISME ENERGETIQUE

La dérégulation du transport axonal peut aussi avoir une répercussion sur le métabolisme énergétique des MNs puisque les mitochondries sont transportées le long de l'axone sur les MTs. Plusieurs mutations associées à la SLA jouent un rôle au niveau de la mitochondrie : **CHCHD10** (Bannwarth et al., 2014; Johnson et al., 2014a), **SOD1**, **VAPB**, ou encore **VCP** (Muyderman and Chen, 2014) ce qui n'est pas étonnant considérant le besoin énergétique énorme des MNs. Des changements morphologiques mitochondriaux ont déjà été observés chez des individus atteints de SLA (Sasaki and Iwata, 2007).

Higgins et al. ont observé la présence de la protéine SOD1 mutée dans l'espace intermembranaire mitochondrial des souris SOD1^{G93A} et suggéré que cela pouvait entraîner la dégénérescence des mitochondries (Higgins et al., 2003). *Magrané et al.* ont montré que cette mutation chez le modèle de souris SOD1, n'altérait pas seulement la forme mais aussi la distribution des mitochondries qui se regroupaient dans les axones (Magrané et al., 2014). Aussi, *Vande Velde et al.* ont montré que l'organisation en réseau des mitochondries somatiques était perturbée chez la souris mutée SOD1 présymptomatique (Vande Velde et al., 2011).

Quant à la protéine TDP-43, *Wang et al.* ont montré qu'elle s'accumulait dans les mitochondries de neurones de certains patients SLA. Chez la souris TDP43^{A315T}, ils ont montré que la diminution mitochondriale de la protéine diminuait la perte neuronale et améliorait le phénotype moteur (Wang et al., 2016). *Magrané et al.* ont aussi observé que des anomalies morphologiques apparaissaient avec la progression de la pathologie chez la souris TDP43^{A315T} soit plus tard que chez la souris SOD1 mutée où les défauts ont été observés avant l'initiation de la pathologie (Magrané et al., 2014).

Que ce soit pour les modèles murins mutés au niveau de SOD1 ou TDP-43, il a été montré que le transport mitochondrial antérograde, essentiel à l'apport en ATP tout le long de l'axone, était perturbé en post-symptomatique à la différence du transport rétrograde dont les défauts apparaissaient plus précocement (Magrané et al., 2014).

Ces données montrent bien l'importance de l'apport en énergie aux MNs et pourraient expliquer une part de la vulnérabilité spécifique de ces cellules (Turner et al., 2013).

5. EXCITOTOXICITE

Les neurones sont des cellules sensibles à l'excitotoxicité induite par une stimulation excessive du glutamate. L'activation soutenue des récepteurs dendritiques par ce neurotransmetteur peut entraîner la dépolarisation prolongée des neurones et peut entraîner la mort de la cellule (Doble, 1999; Van Den Bosch et al., 2006).

Des études ont montré que le glutamate était anormalement relargué au niveau des terminaisons nerveuses de la moelle épinière des souris SOD1^{G93A} présymptomatiques (Bonifacino et al., 2016; Milanese et al.) et que les MNs spinaux étaient hyperexcitables (Jiang et al., 2017). En outre, le récepteur EAAT2, qui recapture le glutamate serait sous-représenté dans les astrocytes de patients et de souris mutées au niveau du gène SOD1. Les astrocytes ne seraient donc pas capables de capturer le surplus de glutamate à la synapse ce qui renforcerait le phénotype hyperexcitable (Taylor Rosenblum and Trotti, 2017). Empêcher la dégradation de EAAT2 ou augmenter son expression a d'ailleurs permis d'améliorer la survie des souris SOD1^{G93A} en retardant la progression de la maladie (Guo et al., 2003; Rosenblum et al., 2017). Ces résultats suggèrent que la perte d'EAAT2 contribue à la dégénérescence des MNs mais ne la cause pas.

De plus, la vulnérabilité des MNs, humains et murins, serait exacerbée par une dérégulation des sous-unités du récepteur AMPA ce qui les rend plus perméables aux ions Ca²⁺, nécessaires au déclenchement des potentiels d'action (Kawahara et al., 2003; Van Damme et al., 2002). *Van Damme et al.* ont en effet démontré que la déficience en GluR2, une sous unité du récepteur AMPA accélérerait la pathologie du modèle murin SOD1^{G93A} (Van Damme et al., 2005).

A noter que le Riluzole, qui est un traitement donné aux patients permettant d'augmenter l'espérance de vie de quelques mois, exercerait un effet protecteur via son action sur l'excitabilité neuronale, notamment en diminuant les courants Na⁺ persistants (Bellingham, 2011).

CHAPITRE 3 : LES MOTONEURONES, CLEFS DU MOUVEMENT VOLONTAIRE

Que ce soit le SNC ou le SNP, tous deux transmettent des informations motrices ou sensibles. Nous possédons un système moteur volontaire qui nous permet de bouger en se chargeant de transmettre les informations de notre cerveau jusqu'à nos muscles squelettiques et un système nerveux autonome qui nous permet par exemple de réagir lorsqu'on se brûle, de réguler nos battements cardiaques en fonction des besoins, de respirer ou de digérer.

Dans les parties qui suivent, sera exposé comment la motricité volontaire s'organise pour transmettre l'information du SNC et provoquer une contraction musculaire avec un focus sur la voie pyramidale et les différents MNs empruntant cette voie. Dans un troisième temps, les différences de vulnérabilité cellulaire puis subcellulaire des MNs à la SLA seront présentées.

I. DE L'IDEE AU MOUVEMENT

Afin de produire un mouvement¹¹ plusieurs étapes sont nécessaires : la prise de décision, la programmation puis l'exécution de celui-ci (Allen et Tsukahara 1974; Cheney 1985). L'exécution en tant que telle dépend de deux voies motrices : la voie pyramidale, responsable de la motricité volontaire propre et la voie extrapyramidale qui permet d'affiner ce mouvement. Le diagnostic de SLA est posé lorsque l'individu montre des signes de dégénérescence sur l'ensemble de la voie pyramidale (Brooks, 1994a; Brooks et al., 2000).

1. LA VOIE PYRAMIDALE

La voie pyramidale (**Fig. 14**) véhicule les informations depuis le cortex jusqu'aux muscles qui se contractent au passage de l'influx nerveux¹². Elle comprend la voie cortico-spinale, connectée aux MNs spinaux et la voie cortico-bulbaire ciblant les nerfs crâniens moteurs (Knierim s. d.; Hasboun 2013).

En ce moment, vous lisez de gauche à droite, vos yeux bougent, vous utilisez la voie cortico-bulbaire responsable de la motricité de la face (**Fig. 14**). Cette voie fait intervenir des neurones corticaux qui se connectent aux noyaux moteurs des nerfs crâniens tout le long du tronc cérébral de façon directe ou indirecte par le biais d'interneurones (Hasboun, 2013; Knierim, 2018).

¹¹ Mouvement : mise en jeu de deux muscles antagonistes afin que l'articulation soit mobilisée

¹² La voie pyramidale est différente entre les primates et les rongeurs. Chez les primates, la voie pyramidale descend du côté ventral et latéral de la moelle épinière alors que chez la souris, elle ne descend qu'en position dorsale. De plus, à la différence des primates, les souris n'ont pas de connexions monosynaptiques entre les MNs corticaux et spinaux (Bray, 2017).

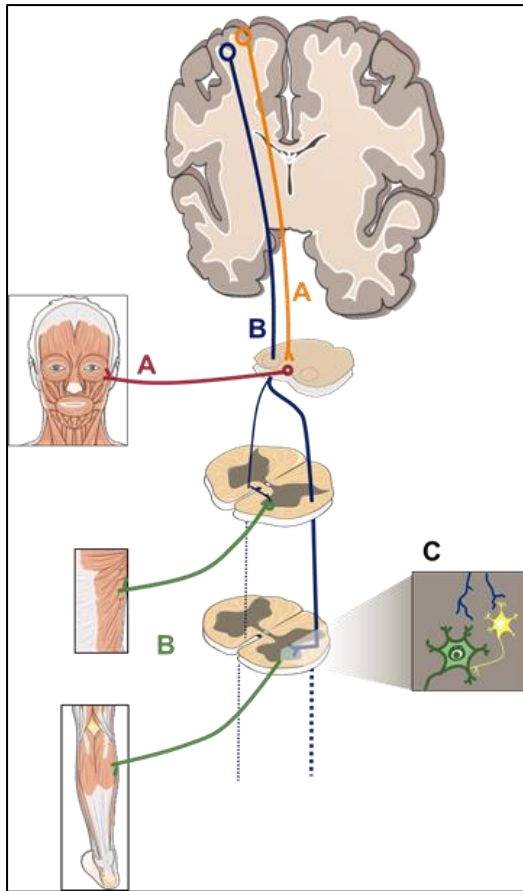


Figure 14 | La voie pyramidale.

A) Voie cortico-bulbaire. Les neurones du cortex moteur (orange) se connectent aux MNs bulbaires (rouge) pour innervent les muscles de la face. **B)** Voie cortico-spinale. Sa partie corticale (bleu) se divise en deux : 90% décussent au niveau bulbaire pour se connecter aux MNs spinaux et innervent les muscles des membres contralatéraux. Les 10% restants continuent en ipsi-latéral puis croisent la ligne médiane au moment de se connecter aux MNs spinaux pour innervent les muscles axiaux contralatéraux.

C) Que ce soit au niveau bulbaire ou le long de la moelle épinière, chaque neurone se connecte aussi à un interneurone (jaune). Ce circuit permet notamment la coordination des mouvements. *Hasboun, 2013; Knierim, 2018.* Réalisée à partir d'images Servier Medical Art via la license CC 3.0.

Vous arriverez bientôt à la fin de la page que vous pourrez tourner grâce à la voie cortico-spinale (**Fig. 14**). Les premiers MNs de cette voie prennent aussi naissance au niveau du cortex moteur. Ils descendent tout le long du tronc cérébral jusqu'au bulbe rachidien. Parmi ces neurones, environ 90% croiseront la ligne médiane à ce niveau et passeront dans le cordon ventro-latéral de la moelle épinière pour former la voie cortico-spinale croisée. A chaque segment médullaire, une partie des fibres de cette voie se connecte sur des MNs, directement ou indirectement par le biais d'interneurones. Ces MNs innervent alors les muscles des membres. Les 10% restant continuent en ipsi-latéral. Ils forment le faisceau cortico-spinal ventral en se projetant sur les MNs et interneurones qui relient les muscles axiaux, responsables des mouvements du tronc et donc de la posture (Hasboun, 2013; Knierim, 2018).

Les individus atteints de SLA perdent cette capacité exécutive puisque ce sont les MNs de la voie pyramidale qui dégénèrent, entraînant des symptômes caractéristiques d'une atteinte des neurones du cortex moteur et caractéristiques d'une atteinte des MNs. Le tableau ci-dessous présente les signes cliniques associés à une atteinte de la voie pyramidale complète ou partielle (**Tableau 6**).

	SLA	Neurones du cortex moteur	MNs bulbaires et spinaux
Atteinte des groupes musculaires	Petite puis large	Large	Petite
Atrophie musculaire	Oui	Rare	Oui
Faiblesse musculaire	+++	+	+++
Fibrillations	Oui	Non	Oui
Fasciculations	Oui	Non	Oui
Spasticité et Hyperflexie	Oui	Oui	Non

Tableau 6 | Signes cliniques associés à une atteinte de la voie pyramidale complète ou partielle.

Par définition la SLA est une maladie affectant l'ensemble de la voie pyramidale, caractérisée par une atteinte des neurones du cortex moteur et une atteinte des MNs. L'atteinte des neurones du cortex moteur est caractérisée par une atteinte de larges groupes musculaires alors qu'une atteinte des MNs inférieurs peut être limitée à un petit groupe de muscles. La SLA commence généralement par affecter un petit groupe de muscles puis s'étend à l'ensemble des muscles volontaires. En résulte une atrophie musculaire, observée lors d'une atteinte des MNs inférieurs. Lors d'une atteinte des neurones du cortex moteur, l'atrophie est plus rare car les muscles continuent de recevoir les facteurs trophiques des MNs inférieurs toujours présents. A cause de l'atrophie des muscles, l'atteinte des MNs inférieurs se traduit par une faiblesse très importante jusqu'à la paralysie alors que l'affection supérieure entraîne une faiblesse plus graduée (parésie). Les fasciculations (contractions involontaires et isolées) et la spasticité (contraction continue) sont deux symptômes précoces de SLA. En cas d'atteinte des neurones du cortex moteur, les MNs sont constamment activés car ils ne reçoivent plus l'information d'arrêter le mouvement. Se produit alors une spasticité musculaire et une augmentation du tonus qui se traduit généralement par des crampes. Les fibrillations sont des symptômes communs à l'atteinte des MNs inférieures et à la SLA. Ce sont des contractions dues aux fibres axonales restantes. L'hyperflexie (augmentation du réflexe d'étirement) est typique d'une atteinte des neurones du cortex moteur alors qu'elle est absente ou faible lors d'une atteinte des MNs inférieurs (Knierim. 2018, Talman et al. 2016).

2. LA VOIE EXTRAPYRAMIDALE

La perturbation de la voie extrapyramidale n'entre pas dans les critères de l'Escorial pour poser le diagnostic de SLA mais constitue une variante de la pathologie (Brooks, 1994b; Brooks et al., 2000). En effet, plusieurs études ont montré que des individus atteints de SLA pouvaient montrer des signes cliniques extra-pyramidaux (McCluskey et al. 2014). Cette voie fait intervenir les noyaux gris centraux et le cervelet. Un dérèglement de noyaux de la base perturbera le mouvement mais ne va pas l'empêcher. Cela provoque des difficultés à initier le mouvement ou des mouvements anormaux. C'est le cas des patients atteints de la maladie de Parkinson ou de la chorée de Huntington. Bien que rares, des cas de Parkinson et SLA concomitants ont déjà été rapportés (Zoccollella et al. 2002). De façon surprenante, l'agrégation de la protéine SOD1 mal conformée a été associée à la perte neuronale observée chez des individus atteints de la maladie de Parkinson

(Trist et al. 2017). Le cervelet permet quant à lui de coordonner et de synchroniser les mouvements. De ce fait, des lésions au niveau du cervelet provoqueront entre autres des troubles de l'équilibre et de la posture. Des pertes neuronales de cellules cérébelleuses ont aussi été observées chez certains individus atteints de SLA (Tan et al. 2016; Prell et Grosskreutz 2013).

II. L'EXCITABILITE DES MOTONEURONES DE PATIENTS SLA

Les fasciculations et les crampes caractéristiques des individus atteints de SLA sont signes d'une perturbation de l'excitabilité des MNs (Kanai et al., 2006). Principalement deux techniques permettent dorénavant d'évaluer l'excitabilité des MNs corticaux ou spinaux chez les patients. La stimulation magnétique transcrânienne (TMS) est une technique qui permet d'évaluer l'intégrité fonctionnelle du cortex moteur et des neurones du cortex moteur (Geevasinga et al., 2014; Vucic et al., 2013). Les techniques de « *threshold tracking nerve conduction studies* » (TTNCS) permettent de mesurer l'excitabilité axonale au niveau du site de stimulation, ici le nerf médian moteur (Nakata et al., 2006), et donc d'estimer l'excitabilité des MNs spinaux. Majoritairement deux équipes – du Dr Kiernan et du Dr Hattori – se focalisent sur ces perturbations des MNs dans la SLA et ont suggéré que les deux types de MNs étaient hyperexcitables (**Tableau 7**).

Les études qui ont mesuré l'excitabilité corticale s'accordent sur le fait que le réseau cortical des patients SLA est hyperexcitable. De façon intéressante, les travaux de Vucic et al. ont suggéré que l'hyperexcitabilité est pré-symptomatique (Vucic et al., 2008) et pourrait être due à une perturbation des circuits inhibiteurs GABAergiques qui augmenterait avec la progression de la maladie (Shibuya et al., 2017; Vucic et al., 2009).

Plusieurs études ont postulé que l'augmentation d'excitabilité et des crampes est associée aux changements de densité des courants ioniques et serait préalable à la mort neuronale (Iwai et al., 2016; Kanai et al., 2006; Tamura et al., 2006). Des études TTNCS ont suggéré qu'une augmentation des courants sodiques (Na⁺) persistants et qu'une diminution des courants potassiques (K⁺) prédisposeraient les axones spinaux de patients SLA à générer des fasciculations et des crampes (Vucic and Kiernan, 2006). L'altération serait plus prononcée au niveau distal (Nakata et al., 2006) supportant l'hypothèse de *dying-back* où l'axone dégénère avant le soma (Fischer et al., 2004). Une étude immunohistochimique a rapporté que l'expression des canaux Kv1.2 était réduite dans les racines de tissus *post-mortem* de patients SALS, ce qui pourrait expliquer la diminution des courants K⁺ (Shibuya et al., 2011). Tamura et al. avaient d'ailleurs suggéré en 2006 que le Mexilétine – bloqueur de courants sodiques – pouvait être un potentiel traitement (Tamura et al., 2006). De façon intéressante, l'augmentation des courants Na⁺ persistants semble être associée à une diminution de l'espérance de vie de patients atteints de SLA (Kanai et al., 2012). Depuis, trois essais cliniques au Mexilétine ont été lancés, dont un était en phase IV (NCT01811355) dès 2013.

D'autre part, une étude sur 18 individus atteints de SLA a montré que plus de la moitié d'entre eux avaient une atteinte des fibres sensibles suggérant que bien qu'à un moindre degré, ce ne sont pas seulement les fibres motrices qui peuvent être atteintes dans cette maladie (Isak et al., 2016).

Nombre de patients SLA	Protocole	Conclusion	Réf.
Excitabilité corticale			
60	TTNCS nerf médian du poignet et TMS	Hyperexcitabilité corticale présymptomatique (SOD1)	(Vucic et al., 2008)
45	TTNCS nerf médian du poignet et TMS	Hyperexcitabilité corticale spécifique à la SLA	(Vucic et al., 2008)
15	TTNCS nerf médian du poignet et TMS	Perturbation circuits inhibiteurs intracorticaux	(Vucic et al., 2009)
24	TTNCS nerf médian du poignet et TMS	Hyperexcitabilité corticale préalable à la dysfonction des MNs spinaux	(Menon et al., 2015)
19	TMS	Hyperexcitabilité corticale (C9ORF72)	(Schanz et al., 2016)
189	TTNCS nerf médian du poignet et TMS	↑ Perturbation circuits inhibiteurs intracorticaux avec la progression de la SLA	(Shibuya et al., 2017)
Excitabilité spinale			
26	TTNCS nerf médian au poignet	↑ courant Na+ persistants ↓ courants K+	(Vucic and Kiernan, 2006)
22	TTNCS nerf médian du poignet et « point moteur » (axones plus distaux)	Perturbations des canaux K+ en position plus distale qu'en amont du nerf.	(Nakata et al., 2006)
36	TTNCS nerf médian du poignet	↑ courants Na+ persistants	(Tamura et al., 2006)
58	TTNCS nerf médian du poignet	↑ courants Na+ puis ↓ courants K+	(Kanai et al., 2006)
112	TTNCS nerf médian du poignet	↑ courants Na+ persistants corrèle avec une survie plus courte	(Kanai et al., 2012)
140	TTNCS nerf médian du poignet	↑ courants Na+ persistants puis ↓ courants K+	(Iwai et al., 2016)

Tableau 7 | Excitabilité corticale et spinale des MNs de patients SLA. L'excitabilité corticale mesurée par les techniques de stimulation transcrânienne (TMS) et l'excitabilité spinale mesurée par les techniques de *threshold tracking* (TTNCS) ont suggéré que le réseau cortical et le réseau spinal des patients SLA étaient hyperexcitables.

III. LA DIVERSITE DES MOTONEURONES SPINAUX

Comme expliqué ci-dessus, la voie pyramidale est formée de deux grands types de neurones selon leur localisation somatique : les neurones du cortex moteur qui sont glutamatergiques et les MNs bulbaire et spinaux qui sont acétylcholinergiques. Si tous les MNs spinaux sont cholinergiques, ils ne sont pas tous identiques et ne sont pas tous aussi sensibles à la dégénérescence. Il est possible de les classer d'un point de vue anatomique et fonctionnel.

1. DU POINT DE VUE ANATOMIQUE

Tout au long de la moelle épinière, les corps cellulaires des MNs projettent leurs axones dans différentes directions pour se connecter à des types de muscles particuliers. A chaque segment médullaire, une partie des fibres de la voie cortico-spinale se termine sur des colonnes de MNs qui elles-mêmes se subdivisent en « *pool* » de MNs (groupe de MNs qui innerve un seul muscle). Chaque colonne et chaque *pool* occupent une place spécifique le long de la corne ventrale de la moelle épinière, quel que soit l'axe anatomique, suivant une topologie logique en fonction des muscles qu'ils ciblent (Dasen and Jessell, 2009).

On distingue 6 colonnes (**Fig. 15**) :

La colonne LMC (*lateral motor column*) est la plus latérale. Elle innerve les muscles des membres. Il existe une colonne brachiale (pour le membre supérieur) et une colonne lombaire (pour le membre inférieur). Cette même colonne se subdivise en 2 à chaque niveau, LMC latérale et LMC médiane. Les MNs des *pools* latéraux innervent préférentiellement les muscles extenseurs dorsaux alors que les *pools* médians innervent les muscles fléchisseurs ventraux. Les membres étant

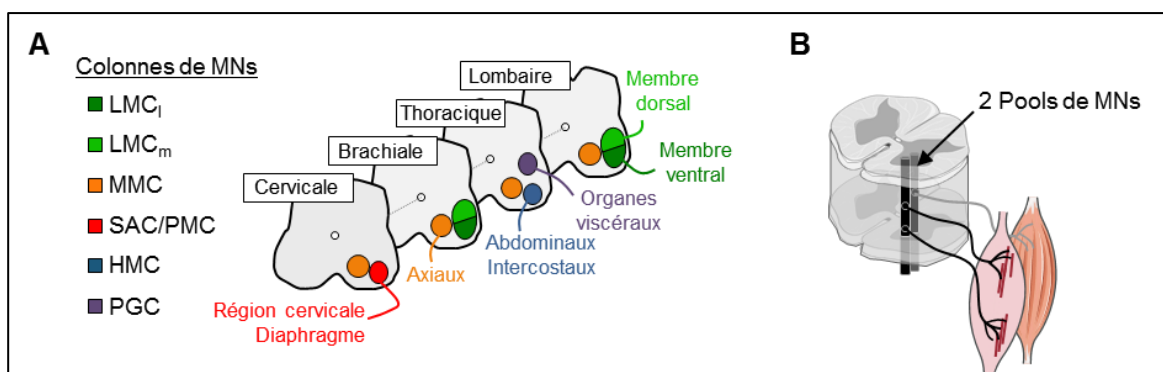


Figure 15 | Les colonnes de MNs sont subdivisées en « *pool* » de MNs. A) Colonnes de MNs le long de la moelle épinière. De façon logique les colonnes de MNs destinées aux membres (LMC) sont retrouvées au niveau brachial et lombaire alors que les colonnes destinées aux muscles axiaux (MMC) sont retrouvées tout le long de la moelle épinière. Inspirée de *Davis-Dusenbery et al. 2014*. B) Ces colonnes se divisent en groupes de MNs destinés à innerver un même muscle (*Pools*). Réalisée à partir d'images Servier Medical Art via la license CC 3.0.

souvent les premiers atteints dans la SLA, c'est donc cette colonne qui est la plus touchée (Swinnen and Robberecht, 2014).

La colonne MMC (*median motor column*) est la plus interne et la plus longue des colonnes. Elle se situe tout le long de la moelle épinière et regroupe les corps cellulaires des neurones innervant les muscles axiaux (Dasen et Jessell 2009; Gutman, Ajmera, et Hollyday 1993).

La colonne SAC (*spinal accessory column*) et la **PMC** (*phrenic motor column*) se trouvent au niveau cervical de la moelle. SAC innerve les muscles mastoïdiens et 4 muscles du cou (Brichta, Callister, et Peterson 1987), tandis que la PMC innerve le diaphragme, essentiel à la respiration (Song, Ashwell, et Tracey 2000; Webber et Pleschka 1976; Allan et Greer 1997). Dans la majorité des cas, les individus atteints de SLA décèdent d'une insuffisance respiratoire causée par la faiblesse du diaphragme (Braun et al., 2018).

La colonne HMC (*hypaxial motor column*), se trouve au niveau thoracique et innerve les muscles intercostaux et abdominaux (Gutman, Ajmera, et Hollyday 1993).

La colonne PGC (*preganglionic motor column*) est constituée de deux parties, une thoracique, et l'autre sacrée. Toutes deux sont impliquées dans le système nerveux autonome et ne jouent donc pas de rôle dans la motricité. Cette colonne serait donc épargnée par la SLA. Les fonctions de ces MNs viscéraux ont été résumé par Stifani (Stifani 2014).

2. DU POINT DE VUE FONCTIONNEL

Chaque groupe de MNs innerve un seul muscle et partage des caractéristiques moléculaires et morphologiques qui lui est propre (Dasen et Jessell 2009; Stifani 2014). Bien qu'avec une signature particulière, un *pool* de MNs rassemble des MNs aux propriétés fonctionnelles différentes, définies par le type de fibres musculaires qu'ils ont pour cible. Un même MN peut innerver plusieurs fibres (unité motrice) mais chaque fibre musculaire est innervée par un seul et unique MN.

Un muscle est donc composé de plusieurs types de fibres (intrafusales et extrafusales) innervées par un type de MNs particulier (**Fig. 16**). Les fibres intrafusales, impliquées dans la proprioception et la sensibilité du muscle sont innervées par les MNs γ . Les fibres extrafusales se subdivisent en 3 : les fibres à contractions lentes (SFR, *Slow Fatigue-Resistant*), intermédiaires (FFR, *Fast Fatigue-Resistant*) et rapides (FF, *Fast-Fatiguable*) qui sont innervées respectivement par les MNs α -lent, α -intermédiaire et α -rapide. Les fibres extrafusales sont responsables de la contraction musculaire et du mouvement. Les MNs β innervent les deux types de fibres musculaires, intra et extrafusales (Purves et al., 2001a, 2001b).

Les fibres dites lentes, ont un pouvoir faible, mais une grande résistance à la fatigue. Au contraire, les fibres dites rapides y sont très sensibles. Puisque tous les muscles n'ont pas les mêmes fonctions et donc pas le même besoin d'apport en énergie ou le même besoin de force, le ratio

entre les différentes fibres varie pour s'adapter à l'activité demandée par le même muscle. Par exemple, les muscles impliqués dans la posture (comme les muscles du dos, du cou, ou des jambes), contiennent une majorité de fibres à contraction lente, donc des MNs α -lents, car ils sont plus résistants à la fatigue et aux exercices prolongés sans nécessiter de contractions fortes (ex : marathon). Les muscles impliqués dans la motricité, surtout les fléchisseurs ou extenseurs que nous sollicitons en permanence, sont constitués en majorité par des fibres rapides, innervées par des MNs α -rapides, adaptées à un effort intense mais pas sur le long terme (ex : sprint, musculation) (Purves et al., 2001b) (**Fig. 16**).

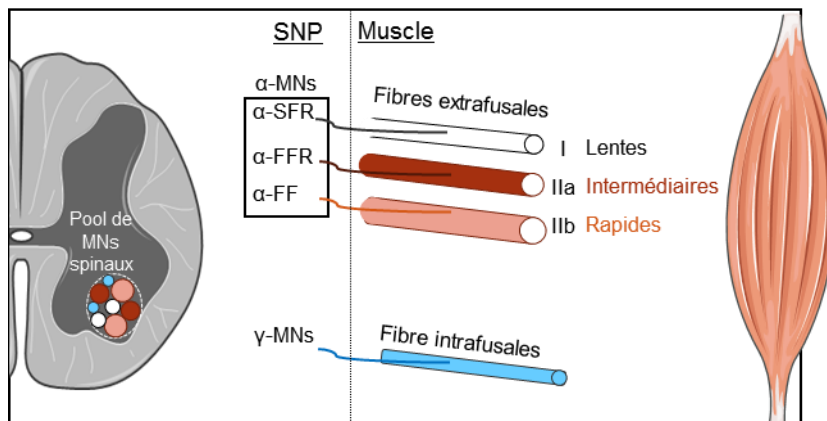


Figure 16 | Les types de MNs spinaux innervant les différentes fibres musculaires. Les MNs α (SFR), intermédiaires (FFR) et rapides (FF) innervent les fibres musculaires extrafusales respectives. Les MNs γ innervent les fibres intrafusales. Les MNs β innervent les 2 types de fibres (non représentées). Les proportions de MNs α varient selon les *pools* de MNs (Stifani, 2014). Réalisée à partir d'images Servier Medical Art via la license CC 3.0.

Le MN innerve un petit nombre de fibres musculaires lorsque les muscles rentrent en jeu pour des mouvements fins, comme les muscles des doigts ou de l'œil. A l'inverse, lorsqu'un mouvement délicat n'est pas nécessaire, et que la coordination n'est pas si importante, un MN innerve beaucoup plus de fibres musculaires (Purves et al., 2001b). Evoquée en amont (**Fig. 14, p.48**), la coordination est permise par des interneurons qui entrent en jeu dans la coordination et la régulation des mouvements. Ces petites cellules se connectent aux MNs α pour intégrer l'information sensorielle et proprioceptive (**Encadré 4**).

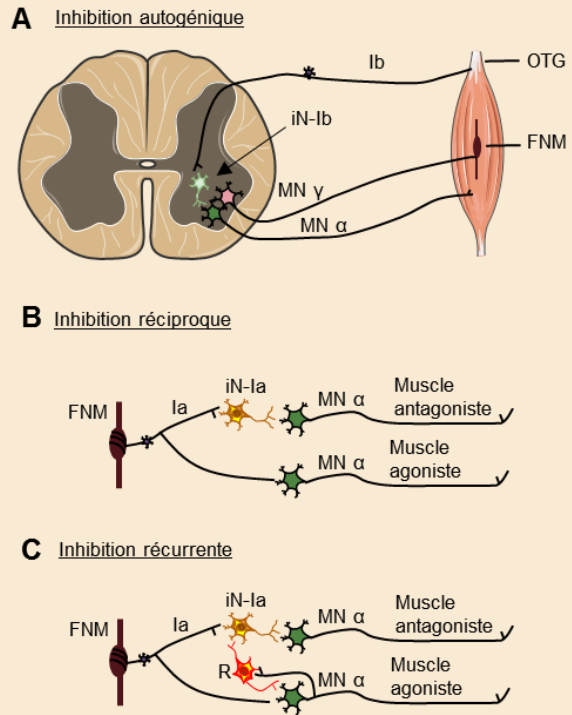
ENCADRE 4. LES INTERNEURONES SPINAUX ET L'INTEGRATION SENSORIMOTRICE

Les interneurones (iN) spinaux permettent la coordination des groupes de muscles, la régulation de la contraction et l'intégration des signaux afférents sensorimoteurs en provenance de deux récepteurs proprioceptifs. L'Organe Tendineux de Golgi (OTG) est localisé entre le tendon et le muscle. Il détecte la force musculaire. Le Fuseau NeuroMusculaire (FNM) est lui localisé au sein même du muscle et se compose de fibres intrafusales contractiles, innervées par des MNs γ . Le FNM renseigne sur le degré d'étirement du muscle (A).

Les **interneurones Ib** sont activés par les neurones afférents Ib des OTG. Ils inhibent l'activité des MNs α homonymes ce qui facilite l'activité des muscles antagonistes.

Les **interneurones Ia** sont activés par les neurones sensitifs Ia du FNM. Ils coordonnent le mouvement en limitant l'activité des muscles antagonistes (B).

Les **cellules de Renshaw «R»** sont activées par les MNs α . Elles inhibent les muscles agonistes et lèvent l'inhibition des muscles antagonistes (C) (Windhorst 2007).



Réalisée à partir d'images Servier Medical Art via la license CC 3.0.

III. VULNERABILITE DES MOTONEURONES A LA SLA

Alors que les gènes mutés dans la SLA s'expriment de façon ubiquitaire, certains groupes de MNs sont plus vulnérables que d'autres et ce dans toutes les formes de SLA. Les MNs crâniens oculomoteurs III, IV, VI (respectivement oculomoteurs, trochléaires et abducens) ainsi que les neurones du noyau de l'Onus sont plus résistants que les MNs spinaux (Nijssen, Comley, et Hedlund 2017). Grâce à cette résistance les patients qui n'ont plus l'usage ni de la parole ni des membres peuvent communiquer via un interface œil/machine (Caligari et al., 2013; Linse et al., 2017).

La vulnérabilité ne s'arrête pas là. Les différents MNs spinaux sont aussi inégaux face à la dégénérescence. Les MNs α -rapide sont endommagés avant les MNs α -lent (Pun et al. 2006), ce qui explique peut-être en partie pourquoi les muscles avec une majorité de fibres rapides, impliqués dans la motricité, sont paralysés en premier dans la majorité des cas (Walhout et al. 2018).

Des études se sont donc intéressées à comparer ces différents types de MNs. Alors que ces cellules portent toutes le nom de « *motoneurone* », elles sont différentes notamment aux niveaux anatomique et fonctionnel (**Tableau 8**) (Nijssen, Comley, et Hedlund 2017).

Type de MNs		Bulbaires		Spinaux	
		Oculomoteurs		α -lents	α -rapides
Anatomique	Modèle d'innervation	Simple et multiple		Simple	
	Unité motrice (MN/fibre musculaire)	1 : 5-20		1 : \geq 300	1 : \geq 300-2000
	Diamètre axonal	+		++	+++
Fonctionnel	Potentiel de repos	-61mV		-70mV	
	Fréquence	100-600Hz		< 100Hz	
	Excitabilité	+++		++	+

Tableau 8 | Différences au niveau anatomique et fonctionnel des MNs bulbaires oculomoteurs et des MNs spinaux α -lents et α -rapides. (Observation faite à partir de rongeurs et de félins).

Les neurones du noyau de l'Onus, abducens et oculomoteurs seraient les seuls à ne pas recevoir de projections directes du cortex (Iwatsubo et al., 1990). Au niveau anatomique, des études chez le chat ont montré que les somas des neurones oculomoteurs seraient plus petits que les MNs α et leur arborisation serait moins complexe. De plus, alors que la majorité des MNs innervent un seul type de fibres musculaires (I, IIa ou IIb), les neurones oculomoteurs peuvent en innover plusieurs. L'unité motrice de l'œil est de l'ordre de 1 MN pour 5 à 20 fibres musculaires contre 1 pour 300 pour les MNs spinaux, et jusqu'à 1 pour 2000 pour les MNs rapides. Le modèle d'innervation et le ratio de l'unité motrice spécifique aux MNs oculomoteurs permettent une régulation plus fine du mouvement (Nijssen et al., 2017).

Au niveau fonctionnel, les MNs se différencient par leurs propriétés électrophysiologiques (**Fig. 17**). Avec un potentiel de membrane au repos plus proche de 0 et une fréquence de décharge en potentiels d'action plus élevée les MNs oculomoteurs sont plus excitables que les MNs spinaux. En outre, grâce à leur plus petite taille et leur résistance d'entrée plus importante, les MNs α -lents se dépolarisent avant les MNs α -rapides. De ce fait, ils sont recrutés en premier lors du mouvement (Mendell, 2005; Stifani, 2014). Enfin, la phase d'hyperpolarisation est plus courte pour les MNs α -rapides ; raison pour laquelle ils se font appeler «rapides» et «lents» ce qui leur permet de déclencher plus rapidement un nouveau potentiel d'action et inversement (Gardiner, 1993).

De plus, ces différents MNs varient aussi au niveau transcriptomique (Hedlund et al., 2010) et protéomique (Comley et al., 2015). Leurs comparaisons ont permis d'ouvrir certaines pistes pour tenter d'expliquer leur résistance ou vulnérabilité. Par exemple, l'IGF1 qui est surexprimé dans les

neurones oculomoteurs de rat pourrait être neuroprotecteur. C'est un facteur de croissance qui stimulerait la synthèse protéique pour favoriser la survie neuronale (Bianchi et al., 2017). Son administration par voie rétrovirale a prolongé la survie des souris SOD1^{G93A} (Kaspar et al., 2003). Cependant, bien que l'expression d'IGF1 soit différentielle chez la souris elle ne l'est pas chez l'homme (Brockington et al., 2013). Cela pourrait expliquer l'échec de l'essai clinique lancé avec l'IGF1 (Sorenson et al., 2008). A l'inverse, le gène *MMP9* qui code pour une métalloenzyme est surexprimé dans les MNs spinaux de la souris et chez l'homme (Brockington et al., 2013). *Kaplan et al.* ont montré que *MMP9* était spécifiquement exprimé dans les MNs α -rapide de souris (Kaplan et al., 2014). Ces résultats ont permis de suggérer que l'enzyme pourrait être un facteur de vulnérabilité, ce qui a d'autant plus d'intérêt puisque *He et al.* ont montré que le polymorphisme de *MMP9* multipliait le risque de développer une forme sporadique de près de 2% (He et al., 2013). La suppression du gène *MMP9* chez la souris SOD1^{G93A}, réduit la dénervation musculaire et la perte de fonction motrice (Kaplan et al., 2014). De plus, l'inhibition de *MMP9* en présymptomatique, mais pas à l'initiation de la pathologie, prolonge la survie des souris SOD1^{G93A} (Lorenzl et al., 2006). *Rozas et al.* ont suggéré que *MMP9* pourrait agir en modulant le stress du RE dès la phase présymptomatique (Rozas et al., 2017).

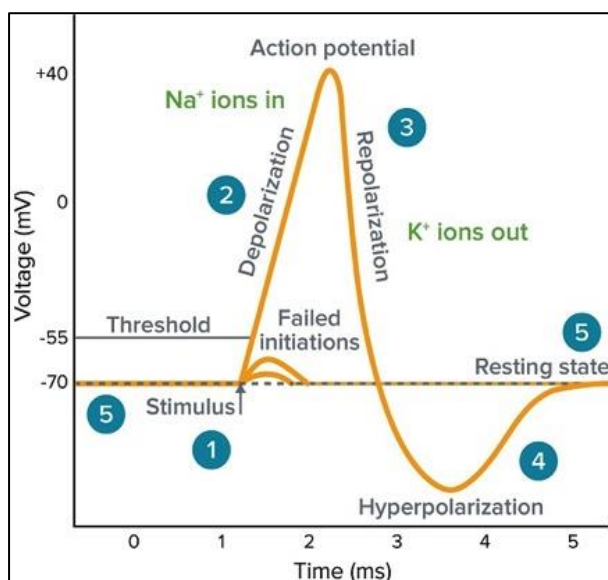


Figure 17 | Le potentiel d'action est une modification temporaire du potentiel de membrane (Coget, 2009). (1) Il est déclenché lorsque l'intensité de la stimulation est supérieure à un certain seuil. (2) Les canaux Na⁺ voltage-dépendants s'ouvrent, laissant passer un influx important de Na⁺ : la cellule se dépolarise. (3) Puis, les canaux Na⁺ s'inactivent, la cellule se repolarise avec un efflux d'ions K⁺ grâce à l'activation des canaux K⁺ voltage-dépendants. (4) S'en suit une période d'hyper-polarisation associée à la fermeture de ces derniers et au retour à l'état de repos (5). (D'après www.moleculardevices.com)

En conclusion, l'ensemble de la voie pyramidale est touché dans la SLA mais les MNs qui la composent le sont de façon différentielle, particulièrement au niveau de la colonne latérale de la moelle où se trouvent les somas des MNs spinaux connectés aux muscles des membres. Mais existe-t-il une vulnérabilité au sein même de la cellule ?

IV. LA VULNERABILITE SUBCELLULAIRE

1. LA VULNERABILITE DES DIFFERENTS COMPARTIMENTS DU MOTONEURONE

Le MN est constitué de plusieurs compartiments qui vont permettre de recevoir, intégrer et transmettre l'information : le soma et ses dendrites, l'axone et la terminaison nerveuse. Une perte somatique, une dégénérescence axonale et une altération des jonctions neuromusculaires (JNMs) sont observées dans les tissus *post-mortem* de patients (Maselli et al., 1993; Saberi et al., 2015). Cependant, ceci ne permet pas de connaître exactement la chronologie des évènements qui conduisent à la neurodégénérescence et à la perte des MNs.

Il a été suggéré en 2001 que la dégénérescence des neurones était cloisonnée avec différents mécanismes subcellulaires pouvant réguler la défaillance de chacun des compartiments (Gillingwater and Ribchester, 2001). Etant donné que les MNs ne se « désintègrent » pas instantanément, il y a un intérêt thérapeutique à trouver le ou les talon(s) d'Achille des MNs, source(s) du déclenchement des mécanismes pathologiques. Autrement dit, y-a-t-il une vulnérabilité subcellulaire localisée à un ou plusieurs des compartiments ?

Un article a montré récemment que face à l'excitotoxicité *in vitro*, les MNs seraient vulnérables au niveau du compartiment somato-dendritique mais pas axonal (Blizzard et al., 2015). Ces résultats allant en faveur de l'hypothèse de « *dying-forward* », où les neurones du cortex moteur hyperexcitables entraîneraient la dégénérescence des MNs de la moelle antérieure (Eisen et al., 1992), plus sensibles à l'excitotoxicité. Néanmoins, les études chez le modèle murin SOD1^{G93A} visant à protéger les corps cellulaires n'ont pas suffi à diminuer la durée de la maladie. En effet, les JNMs étaient dénervées malgré la protection des somas de MNs de souris SLA dont l'expression de la protéine apoptotique Bax était diminuée ou à l'inverse dont l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 était surexprimée (Gould et al., 2006; Kostic et al., 1997). De façon similaire, Suzuki *et al.* ont montré que l'injection de cellules souches neurales synthétisant du GDNF dans la moelle épinière protégeait les MNs mais pas l'innervation musculaire (Suzuki et al., 2007).

Des études de modèles animaux de SLA au stade pré-symptomatique ont permis de mettre en évidence des évènements pathologiques précoces qui surviendraient (Vinsant et al., 2013b). Alors que la perte somatique survient tardivement après la naissance des souris SLA, d'autres anomalies sont observées bien plus tôt. En 2004, l'équipe de Glass a observé qu'avant l'apparition des premiers symptômes de SLA, la souris SOD1^{G93A} n'avait pas de perte somatique mais une perte de 40% des JNMs. Il a alors conclu que la SLA était une axonopathie distale. Malgré tout, les essais thérapeutiques sur des souris SLA qui se sont concentrés sur la JNM ou le muscle n'ont pas permis d'éviter la dégénérescence des MNs (Miller et al., 2006; Towne et al., 2008). D'autres études se sont concentrées sur la période préalable à la dénervation. Ils ont observé des défauts de transports et des défauts électrophysiologiques des MNs porteurs des mutations au niveau du gène SOD1. Ces résultats ont suggéré que des défauts fonctionnels des MNs précèderaient la dénervation et

la dégénérescence axonale (Bilsland et al., 2010; Bories et al., 2007; Durand et al., 2006; Pambo-Pambo et al., 2009; Saxena et al., 2009).

Pour essayer de trouver le site d'initiation de la pathologie, *Vinsant et al.* ont étudié la souris SOD1^{G93A} au niveau de la moelle épinière (somas) et au niveau de la JNM (terminaison axonale) tout au long de la phase présymptomatique. Malgré une étude extensive, ils n'ont pas pu conclure et ont formulé l'hypothèse que plus qu'un seul et même événement, la SLA serait une réponse à un stress résultant de divers mécanismes (Vinsant et al., 2013a).

L'équipe de Dr Hedlund a récemment développé une nouvelle méthode pour isoler le transcriptome des axones moteurs distaux et comprendre la possible vulnérabilité subcellulaire des MNs (Nijssen et al., 2018). Ils ont montré que l'ARNm de la protéine SOD1 (murine) était plus axonale que somatique et que d'autres transcrits nécessaires à la fonction axonale étaient hypo-régulés ou absents dans les axones de souris SOD1^{G93A}, supportant l'hypothèse de « *dying-back* » où l'axone dégénère avant le soma et les premiers symptômes (Dadon-Nachum et al., 2011). A l'inverse d'autres gènes pouvant être le reflet de mécanismes compensatoires étaient induits tels que *NEK1*, dont la perte de fonction attribue une susceptibilité à la SLA (Kenna et al., 2016; Nijssen et al., 2018).

Les deux hypothèses « *dying-back* et *dying-forward* » sont souvent débattues mais n'ont pas à être mutuellement exclusives (Fogarty, 2018). Les défauts au niveau du transport axonal observés chez les animaux modèles mutés au niveau du gène *SOD1* pourraient induire une vulnérabilité somatique et synaptique. Pour exemple, un défaut de transport rétrograde des endosomes pourrait augmenter la formation d'agrégats ou la présence d'organites dysfonctionnels au niveau distal. De plus, un défaut antérograde de mitochondries ou de protéines pourrait induire des perturbations synaptiques et une diminution de l'énergie nécessaire aux MNs tout le long de l'axone (De Vos and Hafezparast, 2017; Perlson et al., 2010).

2. LE CONE D'IMPLANTATION DE L'AXONE ET SON SEGMENT INITIAL

Si plusieurs études se sont concentrées sur les défauts au niveau de l'axone ou de la JNM, très peu d'équipes se sont intéressées à l'implication du segment initial de l'axone (AIS) dans la dégénérescence du MN (**Fig. 18A**). Ce segment, qui sépare physiquement le soma de son axone, est pourtant essentiel puisqu'il constitue le site d'initiation des potentiels d'action qui se propageront le long de l'axone et agit comme un filtre intracellulaire qui permet la polarisation des organelles et la sélection des vésicules axonales (Letierrier, 2018).

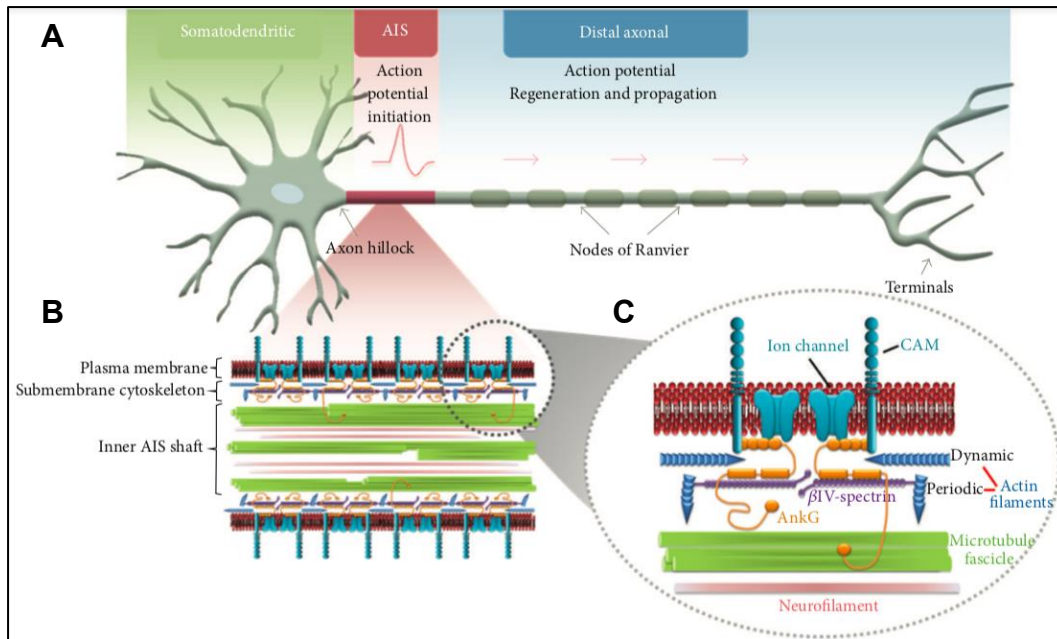


Figure 18 | Le segment initial de l'axone. A) Les différents compartiments neuronaux. Les neurones sont polarisés. Le soma et ses dendrites reçoivent les informations qui sont intégrées au niveau de l'AIS sous forme de potentiels d'action propagés le long de l'axone pour transmettre l'information au muscle de se contracter. **B-C) Structure de l'AIS.** L'AIS est une région dépourvue de myéline qui se situe juste après le cône d'émergence de l'axone (Axone Hillock). **B)** L'AIS peut être divisé en 3 couches : la membrane plasmique, la région sous membranaire, et la région axoplasmique ; chacune ayant une structure particulière. **C)** L'AIS est formé par un complexe protéique constitué de cytosquelette (Actine, Microtubules), de canaux ioniques voltage-dépendants (sodiques, potassiques), de molécules d'adhésion (NrCam, Neurofascine) et d'une protéine d'ancrage : l'ankyrine G (ANKG), indispensable à l'assemblage de l'AIS. D'après Jones and Svitnika, 2016 ; réimprimée avec la permission de *J Neurosci*. via la *Copyright Clearance Center* Licence No 4421390533820.

ROLE ET ARCHITECTURE DE L'AIS

L'AIS est une région plastique qui se situe à la partie proximale de l'axone, juste après son cône d'émergence (Axone Hillock). *Davenne et al.* ont observé qu'à la différence des MNs γ où l'AIS dérivait toujours du soma, l'AIS des MNs α , pouvait aussi dériver d'une dendrite (pour 15% d'entre eux) (*Dufloq et al.*, 2011).

L'AIS est formé par un complexe protéique qui lui est propre et que l'on peut subdiviser en 3 parties: (i) une partie membranaire enrichie en canaux ioniques et protéines d'adhésions ; (ii) une partie sous-membranaire constituée d'Ankyrine G (ANKG) de filaments d'actine et de β IV-spectrine ; et (iii) une partie cytoplasmique où sont retrouvées différentes protéines associées au cytosquelette (Actine, MTs et NFs) comme tout au long de l'axone mais avec quelques différences en terme de structure et d'organisation (**Fig. 18B**) (*Jones and Svitkina*, 2016).

Spécifique de cette région, l'ANKG est une protéine d'ancrage indispensable à l'assemblage de l'AIS mais aussi au maintien de la barrière de diffusion membranaire et du filtre somato-axoplasmique (**Fig. 18C**). La plupart des constituants à l'AIS interagissent directement avec elle (Leterrier, 2018).

Le maintien de la polarité axonale est permis par un contrôle membranaire et intracellulaire dès l'entrée de l'AIS. Les protéines membranaires, tels que les canaux ioniques et les lipides, sont ralenties voire immobilisées grâce à la barrière créée par l'AIS. Les vésicules axonales, transportées par les kinésines peuvent reconnaître les MTs entrant dans l'axone, alors que les vésicules qui pénètrent dans l'AIS et dont les cargaisons sont somato-dendritiques y sont refoulées (Leterrier, 2018).

Le regroupement des canaux Na⁺ et K⁺ voltage-dépendants grâce à l'ANKG est essentiel au déclenchement des potentiels d'action (Nelson and Jenkins, 2017; Pan et al., 2006; Zhou et al., 1998). De plus, la β IV-spectrine régule le regroupement des canaux Na⁺ voltage-dépendants en stabilisant les protéines membranaires et leur liaison au cytosquelette (Komada and Soriano, 2002; Leterrier et al., 2015). La Neurofascine (NF-186) permet de rassembler des composés de la matrice extracellulaire au cytosquelette (Hedstrom et al., 2007) et joue un rôle dans la modulation des potentiels d'action (Zonta et al., 2011). Sans se lier à l'ANKG, les NFs sont aussi présents au niveau de l'AIS mais sont moins phosphorylés qu'en position distale (Hsieh et al., 1994).

Davenne et al. ont décrit la composition des canaux ioniques de l'AIS des MNs de souris. Ils ont observé que la présence de canaux voltage-dépendants K⁺ (Kv1.1, Kv1.2, Kv β 2 et Kv7.2) était homogène dans la population de MNs α (**Fig. 19**). A l'inverse, la composition en canaux Na⁺ voltage-dépendants variait. Tous les AIS des MNs α dérivant du soma possédaient des canaux Nav1.6 et parmi eux 80% avaient aussi des canaux Nav1.1 au niveau proximal. Ils ont suggéré que cette variabilité permettrait de réguler les propriétés électrophysiologiques des MNs (Duflocq et al., 2011).

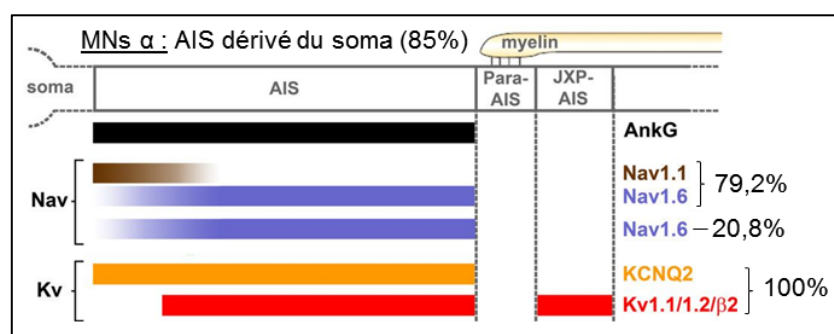


Figure 19 | La répartition des canaux à l'AIS dérivé du soma des MNs α de souris. 85% des MNs ont un AIS dérivé du soma. A l'AIS, est retrouvé la présence de canaux K⁺ voltage-dépendants ainsi que des canaux Na⁺ voltage-dépendants. En plus des canaux Nav1.6, 79,2% des AIS possèdent des canaux Nav1.1. KCNQ2=Kv7.2. D'après Duflocq et al. 2011, Réimprimée via CC License 2.0.

L'AIS ET LA SLA

Alors que l'ANKG n'était pas encore décrite, *Sasaki et al.* ont mis en évidence un défaut au niveau de l'AIS des MNs spinaux d'individus atteints de SLA (Sasaki and Maruyama, 1992a; Sasaki et al., 1989, 1990). Ils ont montré chez 3 patients SLA que le segment était plus large et contenait des accumulations de NFs (Sasaki and Maruyama, 1992a). Ils montreront plus tard par microscopie électronique des anomalies de transport au niveau de la zone proximale de l'axone, marquées par des accumulations de NFs, de vésicules présynaptiques, de mitochondries ou de lysosomes dans les MNs de tissus *post-mortem* d'une dizaine de patients SLA, notamment au niveau de l'Axone Hillock (Sasaki and Iwata, 1996b, 1996c, 2007). Puisque les somas ne sont pas chromatolytiques¹³ et que les accumulations ont aussi été retrouvées dans des tissus de patients ayant une forme rapide de SLA, ils ont suggéré que ce phénomène était précoce et avait un impact sur le transport axonal, notamment le transport rapide médié par les kinésines.

En observant des souris pré-symptomatiques SOD1^{G93A}, ils ont appuyé leur hypothèse selon laquelle les accumulations de NFs et de mitochondries au niveau du segment proximal de l'axone pouvaient être un phénomène précoce. Ils ont suggéré une nouvelle fois une possible perturbation du transport axonal dans la pathogénèse de la SLA (Sasaki et al., 2005b, 2005c).

De façon intéressante deux études transcriptomiques ont révélé que le gène *ANK3* (codant pour l'ANKG) était dérégulé dans les tissus *post-mortem* de moelle épinière de 5 patients SALS et de 2 patients FALS (Dangond et al., 2004), dont un porteur de la mutation SOD1^{A4V}; et plus récemment dans des MNs spinaux issus de biopsies d'individus atteints de SLA (Riva et al., 2016).

D'autre part, de récentes études suggèrent que l'AIS joue un rôle dans plusieurs maladies neurologiques comme l'épilepsie, maladie caractérisée par une hyperexcitabilité neuronale. De nombreuses mutations associées à l'épilepsie concernent des protéines de l'AIS dont des canaux ioniques; par exemple des mutations dans les gènes *SCN8A* ou *KCNQ2/3* (Wimmer et al., 2010). L'AIS a aussi été impliqué dans d'autres pathologies telles qu'Alzheimer ou la schizophrénie (Buffington and Rasband, 2011). *Yuan et al.* ont montré que des mutations au niveau de l'ANK3 augmentaient le risque de développer une schizophrénie (Yuan et al., 2012). Au niveau moléculaire, *Sun et al.* ont observé que l'expression de la protéine ANKG était diminuée dans les neurones de l'hippocampe de souris Alzheimer. De ce fait, l'AIS était dysfonctionnel et n'exerçait plus son rôle de maintien de la polarité axonale. Les canaux Nav.1.6 n'étaient plus restreints à l'AIS et étaient distribués tout le long de l'axone. De plus, la sous-unité du récepteur NMDA (NR2B), était anormalement axonale (Sun et al., 2014).

Pour conclure, l'excitabilité et le maintien de la polarité axonale dépendant crucialement de l'AIS, son altération pourrait entraîner des changements d'excitabilité ou d'adressages importants et avoir un rôle dans la pathogénicité de la SLA. On peut se poser la question de savoir si ces altérations

¹³ Chromatolyse = Dégénérescence, dissolution de la chromatine du noyau d'une cellule; elle marque le dernier stade de l'évolution cellulaire (Définition <http://www.cnrtl.fr>)

observées en *post-mortem* dans les tissus de patients SLA sont un des mécanismes impliqués dans l'initiation de la pathologie.

CHAPITRE 4 : LES MOTONEURONES DERIVES DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES HUMAINES POUR COMPRENDRE LES MECANISMES AUTONOMES DE LA SLA

La technologie des cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSC) (Takahashi et al., 2007) associée à un protocole spécifique de différenciation (Sances et al., 2016) permet aujourd'hui d'obtenir *in vitro* des MNs humains affectés par la maladie de façon patient-spécifique. Ainsi, n'importe quelle forme sporadique ou familiale, peut être étudiée. Depuis le premier protocole publié pour générer des MNs (Lee et al., 2007), plus d'une quinzaine ont été développés pour améliorer notamment la pureté et la rapidité de leur production. La plupart des protocoles publiés à ce jour se focalisent sur les MNs spinaux et feront l'objet de la deuxième partie de ce chapitre. La première partie sera consacrée à la description de la spécification des MNs au cours du développement dont la compréhension a permis le développement des protocoles de différenciation. Enfin, je décrirai dans une troisième partie les différents travaux qui ont été publiés sur des MNs dérivés d'iPSC pour étudier la SLA.

I. LA NEUROGENESE DES MNS SPINAUX

1. DANS LE DEVELOPPEMENT

38 semaines séparent la fécondation de la naissance et les 10 premières suffisent pour mettre en place les prémises de ce qui sera le SNC. La première semaine, le zygote se segmente jusqu'à devenir un blastocyste constitué d'une masse de cellules internes pluripotentes qui donneront l'embryon (**Fig. 20**). Au cours de la troisième semaine de développement la gastrulation commence. Les ébauches des différents organes apparaissent sous forme de 3 feuillets embryonnaires : le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme (Solnica-Krezel and Sepich, 2012). Ce dernier est spécifié par l'activation des voies de signalisation FGF et WNT (Patthey and Gunhaga, 2014; Tchieu et al., 2017). Au niveau de l'ectoderme, des molécules libérées par les cellules avoisinantes (ex : Chordin, Noggin, Follistatin), inhibent la sécrétion de facteurs de différenciation mésodermiques et endodermiques appartenant à la voie BMP et TGF β (Chuang et al., 2015). De ce fait, les cellules ectodermiques adoptent un phénotype neural par défaut : le processus de neurulation a commencé, la plaque neurale s'invagine pour former le tube neural, futur SNC (**Fig. 21**).

Après la neurulation, le tube neural est entouré par des gradients de signalisation et des facteurs morphogéniques le long de l'axe rostro-caudal et dorso-ventral. Les morphogènes induisent l'activation de voies de signalisation qui par l'activation de facteurs de transcription vont moduler l'expression génique responsable de la différenciation cellulaire (Faravelli et al., 2014). Le développement de la partie postérieure du tube neural, future moelle épinière, dépend de

l'expression des gènes *FGFs*, *HOX*, *CDX*, et notamment de l'acide rétinoïque, un dérivé de la vitamine A dont la concentration est plus forte entre le rhombencéphale et le niveau rostral qui va permettre la synthèse de progéniteurs spinaux (Gilbert, 2000). L'expression spécifique de certains facteurs associés aux gènes *HOX*, tel que *FOXP1* est crucial pour la spécification des MNs (Arber, 2008, 2012; Arber et al., 1999; Dasen, 2017). La polarité dorso-ventrale, établie plus tardivement, est induite par l'action de Sonic Hedgehog (SHH) dont la concentration est plus élevée en position ventrale ainsi que WNT et BMP, dont les concentrations sont plus élevées en position dorsale. SHH va induire la dorsalisation des cellules et permettre la genèse des progéniteurs de MNs (Ericson et al., 1996; Lin et al., 2016; Reimer et al., 2009).

2. A PARTIR DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES HUMAINES

Les différents protocoles de différenciation de cellules souches humaines en MNs spinaux développés depuis 2007 sont fondés principalement sur 3 étapes : (i) l'induction neurale au travers de la double inhibition des SMADs¹⁴, (ii) la ventro-caudalisation des cellules par l'exposition à l'acide rétinoïque et à SHH, et (iii) leur maturation grâce aux facteurs neurotrophiques (NTFs). Le **tableau 9 p.68** présente les principaux protocoles décrits dans la littérature depuis 2007 avec les analyses électrophysiologiques réalisées, les sous-types de MNs générés et le pourcentage de différenciation en MNs obtenu (Sances et al., 2016).

INDUCTION NEURALE

L'induction neurale est réalisée sur des cellules adhérentes ou des corps embryonnaires (EBs). Alors que les premiers protocoles consistaient à cultiver les cellules souches et induire leur différenciation neurale spontanée, *Chambers et al.* ont montré que l'inhibition simultanée de 2 voies de signalisation où interviennent des protéines SMADs permettait d'induire un phénotype neural de façon très efficace (Chambers et al., 2009). En effet, alors que dans les premiers protocoles la phase d'induction neurale durait près de 3 semaines, la double inhibition des SMADs a permis de la réduire de deux semaines. La rapidité de la différenciation est permise par l'ajout de SB431542 qui inhibe la voie TGFβ, et Noggin (ou un de ses agonistes : LDN193189, Dorsomorphine, Compound C) qui inhibe la voie des BMPs (**Fig. 20 and 21**). Ensemble, ils permettent de différencier plus de 80% des cellules souches en cellules neurales (Chambers et al., 2009).

SPECIFICATION DES MNS

La spécification des MNs consiste majoritairement en l'ajout de concentrations précises d'acide rétinoïque et de SHH (ou équivalent : Smoothened agonist, SAG) pour « ventro-caudaliser » les

¹⁴ Les SMADs sont des protéines qui régulent la transcription des gènes de la voie TGFβ et BMPs (Attisano and Tuen Lee-Hoeflich, 2001). L'abréviation réfère aux familles de gènes de *C. Elegans* : SMA (pour « small ») et de la *Drosophile* : MAD (pour "Mothers Against Decapentaplegic").

progéniteurs neuraux (**Fig. 20 and 22A, p.69**). En faisant varier les concentrations de WNT, FGF ou SHH, *Maury et al.* ont montré qu'il était possible d'augmenter à près de 80% la proportion des progéniteurs de MNs, marqués par le facteur de transcription Olig2 (*Maury et al.*, 2015), leur permettant d'obtenir des progéniteurs de MNs en 10 jours.

GENERATION DE MNS POST-MITOTIQUES

Les premiers protocoles se contentaient ensuite d'ajouter des NTFs. Mais comme montré dans le **tableau 9** les pourcentages de MNs obtenus restaient faibles. C'est en ajoutant des inhibiteurs de γ -sécrétase (DAPT pour *Maury et al.*, Compound E pour *Du et al.*) que les derniers protocoles ont permis de générer des cultures plus pures de MNs en forçant la conversion des progéniteurs en MNs post-mitotiques tout en augmentant leur maturité (*Borghese et al.*, 2010; *Chen et al.*, 2014; *Du et al.*, 2015; *Maury et al.*, 2015). L'exposition à un cocktail de NTFs tels que BDNF/GDNF le

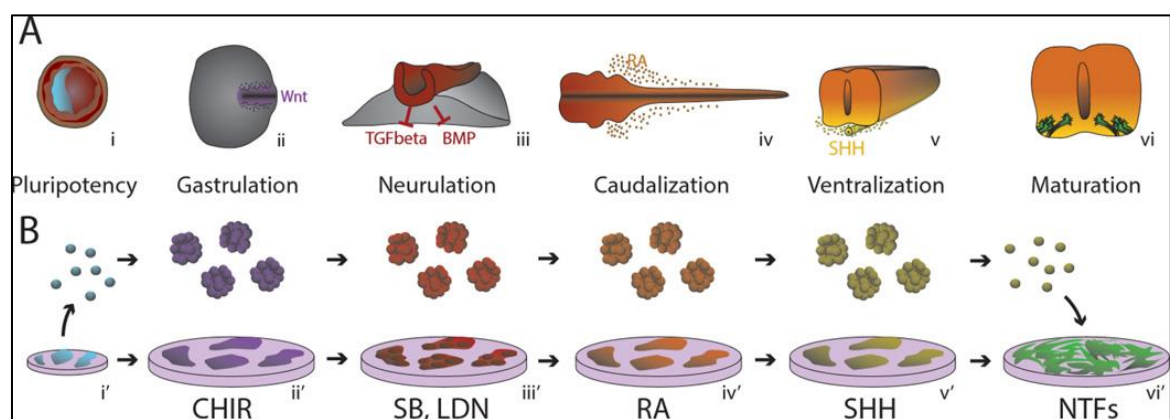


Figure 20 | La « reproduction » du développement des MNs spinaux *in vitro*. Les étapes développementales de la cellule souche humaine au MNs (**A**) sont mimées *in vitro* (**B**). Des cellules pluripotentes issues de blastocystes (i) peuvent être générées *in vitro* par la reprogrammation de cellules humaines somatiques en iPSC (i'). Durant la gastrulation, la ligne primitive Wnt-dépendante se forme (ii). *In vitro*, cette étape est reproduite par le CHIR99021 (CHIR) qui inhibe la kinase GSK3 (ii'). L'inhibition de la voie des BMP et TGF β enclenche la formation du tube neural (iii) ce qui est reproduit par la double inhibition des SMADs par SB431542 (SB) et LDN193189 (LDN) (iii'). L'acide rétinoïque (RA) permet de caudaliser les cellules vers la spécification de neurones spinaux (iv-iv'). Quant à Sonic Hedgehog (SHH), il va établir un gradient pour induire les cellules au niveau ventral de la moelle épinière vers un phénotype motoneuronal (v) ; ce qui est reproduit par l'ajout de SHH ou de molécules agonistes (v'). Enfin, grâce à un support trophique qui va permettre de connecter les axones à leurs cibles, les cellules devenues des progéniteurs de MNs deviennent des MNs fonctionnels (vi). *In vitro*, cette étape est simulée par l'ajout de facteurs neurotrophiques (NTFs) pour promouvoir leur survie et leur maturation (vi'). D'après (*Sances et al.*, 2016) Réimprimée avec la permission de *Nature Publishing Group* via le *Copyright Clearance Center* Licence No : 4385381281151

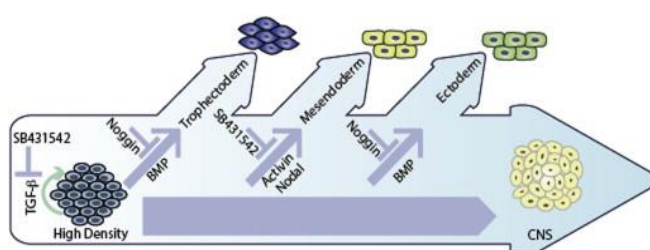


Figure 21 | L'induction neurale est permise par l'inhibition simultanée des voies TGF β et BMPs qui poussent respectivement vers un phénotype mésodermale et endodermale. SB431542 inhibe la voie TGF β . Nooggin inhibe la voie des BMPs. La neuralisation est alors induite par la suppression des destins cellulaires alternatifs (*Borooah et al.*, 2013). Réimprimée avec la permission de *Elsevier Ltd* via le *CC. Licence CC BY-NC-ND 3.0*.

plus souvent avec CNTF ou IGF1 permet de rendre les progéniteurs de MNs plus matures, capables de générer des potentiels d'actions (Lamas et al., 2014) (**Fig. 20**).

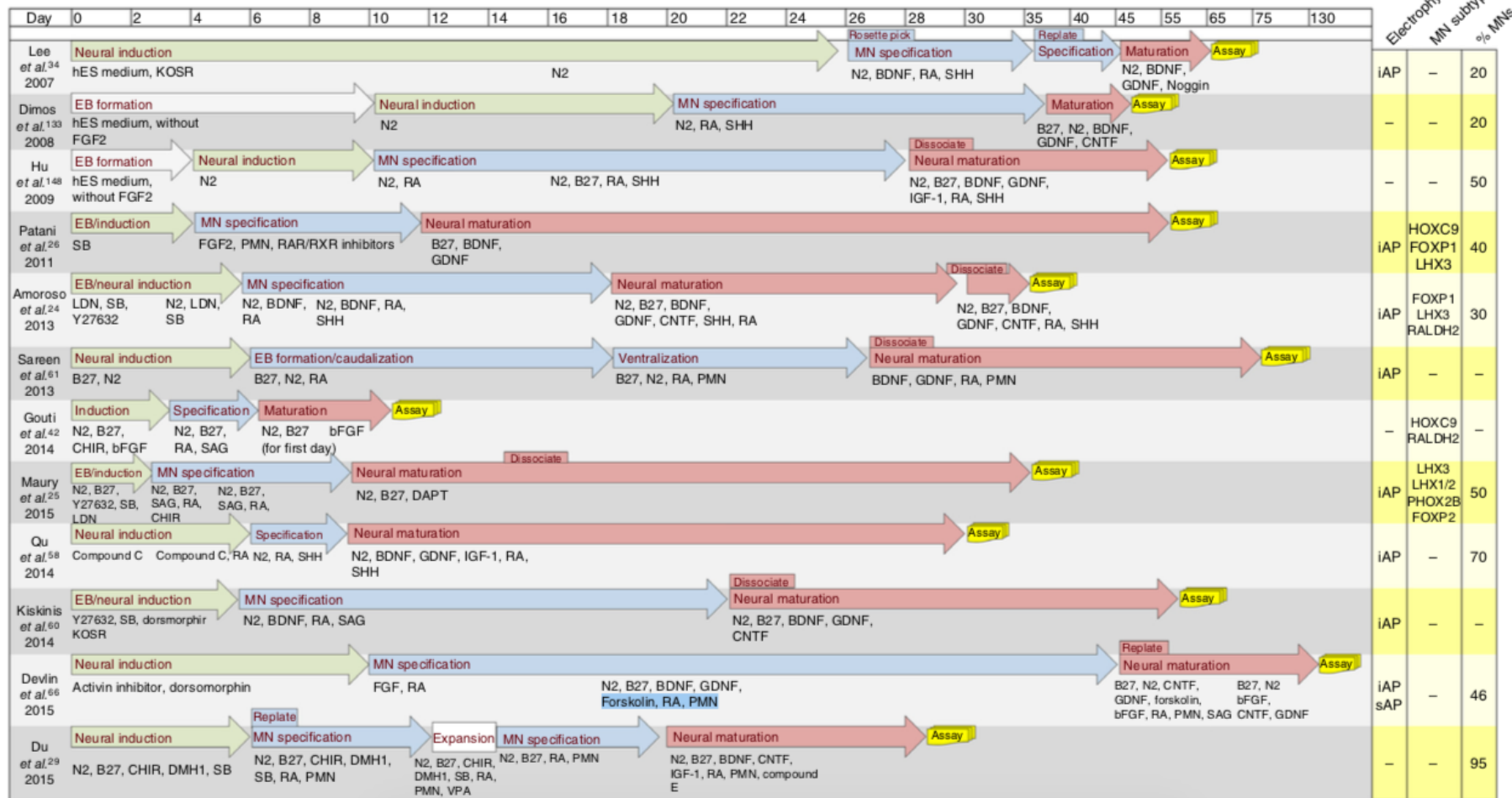


Tableau 9 | Comparaison des différents protocoles publiés pour générer des MNs inférieurs. Trois grandes étapes se succèdent : l'induction neurale (vert) ; la spécification des MNs (bleu) et la maturation (rouge). Fibroblast growth factor 2 (FGF2), brain-derived neurotropic factor (BDNF), glial cell line-derived neurotropic factor (GDNF), ciliary neurotropic factor (CNTF), Acide rétinolique (RA), retinoic acid receptor (RAR), sonic hedgehog (SHH), purmorphamine (PMN). Les colonnes jaunes résument les résultats avec les sous-types de MNs générés, le pourcentage de MNs générés (basé sur l'expression de HB9 ou ISLET1) et leur excitabilité. Potentiels d'action induits (iAP), potentiels d'actions spontanés (sAP), Caudal spinal cord associated Hox family member C (HoxC9). D'après Sances et al., 2016; Réimprimée avec la permission de Nature Publishing Group via le Copyright Clearance Center Licence No : 4385381281151.

SOUS TYPES DE MNS GENERES

Il est rarement spécifié dans les protocoles les sous-types de MNS générés. Or, cela a son importance (cf. [Chapitre 3](#)). Il existe en effet plusieurs facteurs de transcription spécifiques aux MNS en fonction de leur origine au niveau de la moelle épinière ou en fonction du type de fibres musculaires qu'ils innervent (**Tableau 9, Fig. 22B and 22C**) (Francius and Clotman, 2014; Mendelsohn et al., 2017; Stifani, 2014). *Amoro et al.* ont montré que dans la moelle épinière embryonnaire humaine, 44% des MNS étaient uniquement ISLET1¹⁵, 31% étaient HB9, et 25% étaient co-marqués ISLET1 et HB9 (Amoroso et al., 2013). Alors que les facteurs ISLET1 et HB9 sont spécifiques des MNS, LHX3 et FOXP1 permettent de différencier respectivement les MNS de la colonne MMC par rapport à la colonne LMC (Stifani, 2014). RADHL2 est aussi spécifique des MNS de la LMC (Francius and Clotman, 2014; Jessell, 2000). PHOX2B est plus spécifique de la colonne SAC qui innerve notamment le diaphragme (Stifani, 2014). Les facteurs de transcription ERR β (Enjin et al., 2010) et CHODL (Enjin et al., 2010) ou MMP-9 (Kaplan et al., 2014) permettraient de différencier les MNS α -lents des MNS α -rapides.

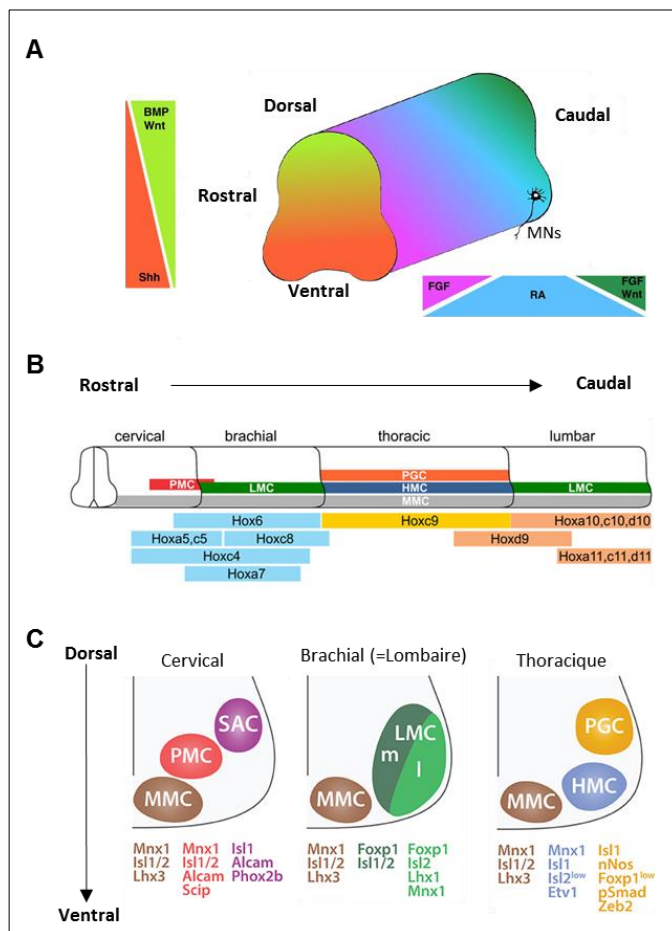


Figure 22 | Spécification des MNS.

A) Les morphogènes modèlent le tube neural le long de l'axe rostro-caudal et dorso-ventral. FGF est très exprimé au niveau rostral et caudal du tube neural. Les plus hauts niveaux d'acide rétinolique (RA) sont retrouvés entre le rhombencéphale et le début de la moelle épinière. BMP est très concentré dans la partie dorsale de la moelle alors que SHH est plus concentré dans la partie ventrale (Favarelli et al. 2014). **B)** Les gènes *HOX* permettent de spécifier les MNS le long de l'axe rostro-caudal (Philippidou Dasen et al. 2011). **C)** Chaque colonne de MNS spinaux exprime des protéines spécifiques : Mnx1 (=HB9), Isl1&2, Lhx1&3, Alcam, Scip, Phox2b, FoxP1, Etv1, nNos, pSmad, Zeb2. (Stifani, 2014). Réimprimée avec la permission de *Frontiers Media SA* et *Stem Cell Res Ther* via le CC, *Licence 4.0* et via le *Copyright Clearance Center* Licence No 4421410204788.

¹⁵ Exemple : les MNS oculomoteurs ne sont pas HB9 positifs (Nijssen et al., 2017).

II. MODELISATION DE LA SLA AVEC DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES HUMAINES

Depuis 2012, des publications rapportent la génération de MNs dérivés d'iPSC de patients SLA porteurs de différentes mutations. La plupart de ces études se sont focalisées sur une seule forme de la pathologie. C'est pourquoi ces travaux seront présentés en fonction des gènes mutés sous forme de tableau. Chacun d'entre eux (**Tableaux 10-13**) référence les publications avec :

- La référence du protocole utilisé dans l'étude et le temps nécessaire pour générer les MNs avant leur maturation,
- la composition des cultures de MNs et la possible présence de glie, ce qui est important pour étudier les défauts intrinsèques spécifiques aux MNs,
- les analyses validant les modèles : présence d'agrégats, survie,
- les nouveaux phénotypes observés (mécanismes possibles).

De façon générale les MNs dérivés de patients SLA ont été comparés à des MNs issus de sujets sains. Afin de diminuer la variabilité due à une différence de fond génétique, certaines études (notées d'une étoile dans les tableaux susmentionnés), ont comparées les MNs dérivés de patients à des MNs isogéniques (Bhinge et al., 2017; Chen et al., 2014; Higelin et al., 2016; Imamura et al., 2017; Naumann et al., 2018; Selvaraj et al., 2018; Wainger et al., 2014). Les travaux qui se sont concentrés sur des études fonctionnelles d'électrophysiologie ainsi que sur des analyses transcriptomiques sont présentées à la fin du chapitre (**Tableau 15-16**).

1. LES ANALYSES PAR MUTATIONS

SOD1

A ce jour, 7 publications ont décrit des modèles d'iPSC de patients porteurs de 7 différentes mutations au niveau du gène *SOD1* (**Tableau 10**) dont des formes plus ou moins lentes (cf. [Tableau 1, p.23](#)) (Bhinge et al., 2017; Chen et al., 2014; Fujimori et al., 2018; Imamura et al., 2017; Kiskinis et al., 2014; Naujock et al., 2016; Wainger et al., 2014).

Sur les 7 publications, 5 protocoles différents ont été utilisés pour générer des cultures de MNs dont la pureté varie de moins de 50% à plus de 94%. Seulement 2 de ces études ont une pureté supérieure à 70% et sont dépourvus de glie (Bhinge et al., 2017; Chen et al., 2014).

VALIDATION

Chen et al. ont observé des agrégats de NFs dès la première semaine de maturation (Chen et al., 2014). De plus, pour presque toutes les lignées d'iPSC, des agrégats SOD1 ont été observés dans les MNs (Bhinge et al., 2017; Chen et al., 2014; Fujimori et al., 2018; Imamura et al., 2017).

Certaines études ont montré une diminution de la survie des MNs de patients mutés au niveau du gène *SOD1* mais cela semble dépendre des conditions de culture (Bhinge et al., 2017; Imamura et al., 2017; Kiskinis et al., 2014).

Mutation <i>SOD1</i>	Obtention MNs	Pureté	Validation	Nouveaux phénotypes	Référence
A4V et D90A*	(Li et al., 2008) 21 jours	>94% TUJ1 >90% HB9	-Agrégats SOD1 (J+9) et NF-L/M/H (J+4) -↓ survie (+20)	-Dégénérescence des neurites (J+9) -Dérégulation des sous unités de NFs (J+9)	(Chen et al., 2014)
A4V*	24 jours (Boulting et al., 2011)	>97% TUJ1 <50% ISLET1 sur de la glie	↓ de la survie (J+30)	-Défaut de la transcription (J+30) -Défaut mitochondrial (J+23-26) -Stress du RE et UPR (J+30)	(Kiskinis et al., 2014) ^{& φ}
A4V*	24 jours (Boulting et al., 2011)	>97% TUJ1 <50% ISLET1		-Hyperexcitabilité (J+14/28, sur glie pour une expérience) -Perte des courants potassiques voltage-dépendants (J+28)	(Wainger et al., 2014) ^{&}
D90A, R115G	36 jours (Naujock et al., 2016)	85% TUJ1 65% ISLET1 25% CHAT		-↓ ratio Na+/K+ (↓ Na+) (J+7) -Hypoexcitabilité (J+7) -↓ mRNA Canaux Na+ (J+7) -↑ UPR et marqueurs apoptotiques (J+7)	(Naujock et al., 2016)
E100G*	14 jours (Maury et al., 2015)	>70% ISLET1	-Agrégats SOD1 (J+16) -↓ de la taille du soma et de la survie (J+20)	-↓ arborisation dendritique (J+20) -Stress du RE (J+23) -perturbation de la transcription (J+16) -↓ taille axone (J+16)	(Bhinge et al., 2017) ^φ
L144FVX* φ	7 jours (Hester et al., 2011)	62% HB9 Glie	-Agrégats SOD1 (J+7) -↓ survie (J+7)	-Phosphorylation voie Src/Abl (J+7) -Perturbation autophagie (J+7) -↑ gènes TCA/chaîne respiratoire (J+7) -↓ ATP (J+7)	(Imamura et al., 2017)
H46R, H43R	(Fujimori et al., 2018) 30 jours	60% HB9 Glie	-Agrégats SOD1 (J+15)	-↓ activité mitochondriale (J+15) -↑ apoptose (J+15) -↑ ROS (J+15) -↓ longueur neurites (J+20)	(Fujimori et al., 2018) ^φ

Tableau 10 | Comparaisons des phénotypes de MNs dérivés d'iPSC porteurs de mutation au niveau du gène *SOD1*. Différents protocoles ont été utilisés pour générer les cultures de MNs. Sont indiqués : le protocole utilisé et le temps de différenciation, les différents pourcentages de neurones générés et les phénotypes mis en évidence (validation et nouveaux phénotypes) avec une estimation de l'apparition du phénotype à partir de la génération des MNs. *Mutations corrigées, φ Etude transcriptomique, & indique deux publications d'un même groupe.

NOUVEAUX PHENOTYPES

Imamura et al. ont suggéré que l'agrégation de la protéine SOD1 mal repliée pouvait augmenter le stress du RE (Imamura et al., 2017). En accord, deux études ont montré que la réponse UPR était activée dès la première semaine de maturation : Eif2 et XBP1s, deux marqueurs de la réponse UPR étaient augmentés dans les MNs SOD1 A4V (Kiskinis et al., 2014) et E100G (Bhinge et al., 2017) respectivement. Ils ont montré que la diminution du stress du RE augmentait la survie de MNs mutants et inversement (Kiskinis et al., 2014). D'après *Kiskinis et al.*, la présence endogène de marqueurs de la réponse UPR dans les MNs contrôles pourrait expliquer la dégénérescence spécifique des MNs par rapport aux autres types neuronaux. D'autant que les MNs les plus larges qui sont aussi les plus sensibles, avaient plus de protéines XBP1s que les plus petits (Kiskinis et al., 2014).

Au 7^{ème} jour de maturation, *Naujock et al.* ont montré que des MNs porteurs de la mutation D90A étaient hypoexcitables (Naujock et al., 2016). De leur côté, *Wainger et al.* ont observé que les MNs SOD1 A4V étaient hyperexcitables après deux semaines de maturation. De façon intéressante, ils ont montré qu'une relation existait entre le stress du RE et le profil de décharge des MNs. L'inhibition chimique de la réponse UPR diminuait la fréquence des potentiels d'action et inversement¹⁶. Aussi, la diminution pharmacologique de l'activité électrique réduisait l'expression de XBP1s, donc de la réponse UPR présente dans les MNs mutés et vice versa¹⁷ (Kiskinis et al., 2014; Wainger et al., 2014).

Lors de la deuxième semaine de maturation, des perturbations de transcription ont aussi été mises en évidence. *Chen et al.* ont montré que l'atrophie des neurites et la mort cellulaire subséquente pouvaient être liées à la déstabilisation des NFs. En effet, ils ont montré que la correction des proportions de sous-unités de NFs permettait de réduire l'agrégation des NFs et la dégénérescence des neurites (Chen et al., 2014). Ce type de résultat est aussi rapporté par d'autres équipes (Bhinge et al., 2017; Fujimori et al., 2018).

Les perturbations du cytosquelette, essentiel au transport des organites ainsi que les agrégats SOD1 pourraient expliquer les défauts mitochondriaux observés vers le 15^{ème} jour de maturation (Imamura et al., 2017; Schwarz and Leube, 2016). *Kiskinis et al.* ont ainsi montré que les mitochondries des MNs SOD1 A4V étaient désorganisées et moins mobiles (Kiskinis et al., 2014). De plus leur équipe ainsi que *Imamura et al.* ont montré que la transcription génétique de la voie mitochondriale était perturbée dans les MNs SOD1 mutés (Imamura et al., 2017; Kiskinis et al., 2014).

¹⁶ Le Salubrinal réduit le stress du RE et le dithiothréitol l'augmente

¹⁷ La Rétigabine et la tétrodontoxine inhibent l'activité électrique alors que le Kainate ou la linopiridine l'accroissent

C9ORF72

Huit groupes différents ont modélisé la SLA de patients porteurs d'expansions G4C2 (Dafinca et al., 2016; Devlin et al., 2015; Imamura et al., 2017; Lopez-Gonzalez et al., 2016; Sareen et al., 2013; Wainger et al., 2014; Westergard et al., 2016), dont deux qui ont principalement étudié l'excitabilité neuronale (Devlin et al., 2015; Wainger et al., 2014) (**Tableau 11**). Seules deux études ont analysé des cultures dépourvues de glie et ont estimé que le pourcentage de MNs dans ces cultures ne dépassait pas 50 % (Selvaraj et al., 2018; Wainger et al., 2014).

C9ORF72	Obtention MNs	Pureté	Validation	Nouveaux phénotypes	Référence
(G4C2)n	27 jours (Sareen et al., 2012)	55,5% SMI32 66,5% TUJ1 25% GFAP et progéniteurs	-Foci d'ARNs (J+48)	-↓Excitabilité (J+39) -Perturbation de la transcription (J+48)	(Sareen et al., 2013)
(G4C2)n	24 jours (Boulting et al., 2011)	>97% TUJ1 <50% ISLET1		-Hyperexcitabilité (J+14)	(Wainger et al., 2014)
(G4C2)n	45 jours (Devlin et al., 2015)	81% TUJ1 45% HB9 19% GFAP		-↓Courants Na ⁺ /K ⁺ voltage-dépendants (J+35) - Hyper (J+21) puis hypoexcitabilité (J+49) -↓Activité synaptique (J+49)	(Devlin et al., 2015)
(G4C2)n	49 jours (Hu and Zhang, 2009) 50 jours (Qu et al., 2014) 29 jours (Shi et al., 2012a)	82% TUJ1 44% ISLET1	-Foci d'ARNs (J+ ?) -DPR (J+ ?) -morphologie anormale des mitochondries (J+ ?)	-Susceptibilité apoptose (J+ ?) -↑Ca ²⁺ dans RE (J+ ?) -↑Autophagie (J+ ?) -↑Granules de stress (J+ ?)	(Dafinca et al., 2016)
(G4C2)n	14 jours (Maury et al., 2015)	Inconnu	-DPR (J+8)	-Transmission de DPR de cellule en cellule (J+8)	(Westergard et al., 2016)
(G4C2)n	31 jours (Amoroso et al., 2013)	80% TUJ1 35% CHAT	-Foci d'ARNs (J+14) -DPR (J+14)	-Perturbation mitochondrie et stress oxydatif (J+56) -Dommage ADN (J+150) (avec le protocole Du, 80% Chat, J+56)	(Lopez-Gonzalez et al., 2016)
(G4C2)n	7 jours (Hester et al., 2011)	62% HB9 Glue	-DPR(J+7) -Diminution survie (J+7)		(Imamura et al., 2017)
(G4C2)n*	14 jours (Maury et al., 2015)	95% TAU 50% ISLET1	-Foci d'ARNs (J+7) -DPR (J+7)	-Dérégulation ARN et protéine de la sous unité AMPAR (J+21) -Sensibles à l'excitotoxicité (J+21) -Pas de différence d'excitabilité (J+7-35)	(Selvaraj et al., 2018) ^φ

Tableau 11, ci-contre | Comparaisons des phénotypes des MNs dérivés d'iPSC porteurs des expansions au niveau du gène C9ORF72. Différents protocoles ont été utilisés pour générer les cultures de MNs. Sont indiqués le protocole utilisé et le temps de différenciation, les différents pourcentages de neurones générés et les phénotypes mis en évidence (validation et nouveaux phénotypes) avec une estimation de l'apparition du phénotype à partir de la génération des MNs. *Mutations corrigées, †Etude transcriptomique. (J+ ?) indique l'impossibilité à estimer le temps d'observation des phénotypes, vu que cette étude a utilisé 3 protocoles différents pour générer des MNs.

VALIDATION

Il a été montré que les MNs mutés au niveau de *C9ORF72* pouvaient contenir des DPR (Dafinca et al., 2016; Imamura et al., 2017; Lopez-Gonzalez et al., 2016; Selvaraj et al., 2018) et/ou des *foci* d'ARNs nucléaires (Dafinca et al., 2016; Lopez-Gonzalez et al., 2016; Sareen et al., 2013; Selvaraj et al., 2018). Seuls *Imamura et al.* ont rapporté que les MNs mutants mourraient avant les contrôles dès la première semaine de maturation (Imamura et al., 2017) mais leurs cultures étaient riches en cellules gliales.

NOUVEAUX PHENOTYPES

Les résultats de *Dafinca et al.* ont suggéré que la perturbation de l'homéostasie protéique dans des MNs porteurs d'expansions G4C2 pourrait jouer un rôle toxique. Ils ont observé que la quantité de protéine p62 (marqueur d'autophagie) et PABP (marqueur de granules de stress) était augmentée dans les MNs mutants. De plus, le taux de calcium était deux fois supérieur à la normale dans le RE, ce qui pourrait favoriser une réponse UPR, entraîner l'accumulation de calcium dans les mitochondries et ainsi participer à la perturbation mitochondriale (Dafinca et al., 2016).

Dans les travaux de *Lopez et al.*, où les MNs ont été cultivés plus de deux mois, les mitochondries étaient dysfonctionnelles. Ils ont démontré que la présence de DPR augmentait le potentiel de membrane des mitochondries de MNs porteurs d'expansions ou de MNs contrôles (Lopez-Gonzalez et al., 2016). A l'inverse, *Dafinca et al.* ont montré que les mitochondries des MNs mutés, dont la morphologie était anormale, avaient un potentiel membranaire plus bas (Dafinca et al., 2016). De plus, les quantités de protéines mitochondriales Bak et le Cytochrome C (apoptotiques) étaient augmentées alors que celles de Bcl-2 (anti-apoptotique) étaient diminuées (Dafinca et al., 2016). Ces résultats suggèrent que la perturbation des mitochondries favoriserait la mortalité des MNs puisqu'une variation du potentiel membranaire mitochondrial est délétère pour la cellule. En effet, sa diminution induit le relargage du Cytochrome C (Mignotte and Vayssiere, 1998) tandis que son augmentation promeut la production d'espèces réactives de l'oxygène (Andrews et al., 2005). Ainsi, *Lopez et al.* ont observé une augmentation de la production de radicaux libres dans les MNs mutés associée à la fragmentation de l'ADN. *Lopez-Gonzalez et al.* ainsi que *Dafinca et al.* ont observé une diminution de la survie associée à une augmentation de l'expression de Caspase-3 (Dafinca et al., 2016; Lopez-Gonzalez et al., 2016).

Le phénotype excitable des MNs mutants semble dépendre du temps auquel il est analysé et de la présence ou non de cellules gliales dans la culture. *Devlin et al.* ont montré qu'après une vingtaine de jours, les MNs mutés étaient hyperexcitables et devenaient hypoexcitables avec le temps. Ils

ont montré que l'hypoexcitabilité était associée à une diminution progressive des courants Na⁺/K⁺ impliqués dans les phases polarisantes et dépolarisantes du potentiel d'action. Ceci est en accord avec les résultats de *Wainger et al.* et *Sareen et al.* qui observent respectivement une augmentation d'excitabilité vers le 14^{ème} jour de maturation et une diminution d'excitabilité le mois suivant (Sareen et al., 2013; Wainger et al., 2014). De plus, *Sareen et al.* ont observé une diminution de KCNQ3 (Sareen et al., 2013) cohérente avec l'hypoexcitabilité des MNs mutés. En revanche, l'équipe de Chandran n'a elle, pas mis en évidence de différence d'excitabilité au cours de la maturation de la culture (Selvaraj et al., 2018) et ont expliqué cette différence par rapport aux études *Devlin et al.*, *Sareen et al.* et *Wainger et al.* par l'absence de glie dans leur culture (Devlin et al., 2015; Sareen et al., 2013; Wainger et al., 2014).

Il a aussi été montré qu'après moins d'un mois de maturation, la transcription était perturbée. Grâce à une analyse transcriptomique, deux équipes ont mis en évidence une diminution des voies régulant la transmission synaptique (Sareen et al., 2013; Selvaraj et al., 2018). De nombreux gènes participants à la formation des synapses étaient dérégulés ainsi que des gènes impliqués dans l'excitabilité neuronale comme KCNQ3, déjà mentionné, qui code pour un canal potassique voltage-dépendant (Sareen et al., 2013). D'autre part, *Selvaraj et al.* ont montré que l'expression de GluA1, une des sous-unités du récepteur AMPAR, était augmentée non seulement dans les MNs dérivés d'iPSC mais aussi dans des tissus *post-mortem* de patients SLA. Cette augmentation rendrait ainsi les MNs plus perméables aux ions Ca²⁺ et donc plus sensibles à l'excitotoxicité (Selvaraj et al., 2018).

TARDBP

Cinq articles ont été publiés par 3 groupes différents sur des MNs portant des mutations au niveau du gène *TARDBP* (**Tableau 12**), en particulier la mutation M337V (Alami et al., 2014; Bilican et al., 2012; Devlin et al., 2015; Egawa et al., 2012; Fujimori et al., 2018). La pureté de la culture en MNs de ces travaux varie de 50 à 80% mais seul la publication de *Bilican et al.* qui a étudié une culture de 50% de MNs, est dénuée de glie.

VALIDATION

La formation d'agrégats contenant TDP-43 est un marqueur de la pathologie. Trois des publications ont donc regardé si l'agrégation typique de TDP-43, nucléaire et cytoplasmique était retrouvée dans les MNs porteurs de mutation *TARDBP* (Bilican et al., 2012; Egawa et al., 2012; Fujimori et al., 2018). *Bilican et al.* n'ont pas observé de relocalisation cytoplasmique à la différence d'*Egawa et al.* mais ils ont tous deux observé une augmentation de la fraction insoluble de la protéine (Bilican et al., 2012; Egawa et al., 2012). De leur côté, *Fujimori et al.* ont observé des agrégats de la protéine pTDP-43 dans le cytoplasme des MNs porteurs de mutations *TARDBP* et une augmentation de l'ARNm de TDP-43 dans les granules de stress (Fujimori et al., 2018).

Fujimori et al. ont observé une diminution de survie des MNs mutés au niveau du gène *TARDBP* à la différence de *Devlin et al.* qui ont étudié la même mutation (Devlin et al., 2015). Les autres études ont démontré que les MNs mutés étaient plus vulnérables en situation de stress oxydatif (Egawa et al., 2012) ou lorsque la voie Pi3k-Akt, impliquée dans le déclenchement de l'apoptose, était modulée (Bilican et al., 2012; Brunet et al., 2001; Zhang et al., 2013).

Mutation <i>TARDBP</i>	Obtention MNs	Pureté	Validation post mortem	Nouveaux phénotypes	Référence
M337V	50 jours (Bilican et al., 2012)	50% HB9	-Agrégats TDP-43 (J+ ?)	-Vulnérabilité inhibition Pi3k (J+ ?)	(Bilican et al., 2012) ^{&}
M337V Q343R G298S	35 jours (Wada et al., 2009)	80% HB9 Glie	-Agrégats TDP-43 (J+10)	-Vulnérabilité stress oxydatif (J+10) -Perturbation de la transcription (dont ↓ NFL/M) (J+10) -↓neurites (J+10)	(Egawa et al., 2012)
G298S A315T M337V	30 jours (Bilican et al., 2012; Dimos et al., 2008)	Très variable Sur de la glie		-Perturbation du transport rétrograde et antérograde de l'ARNm NF-L (+14)	(Alami et al., 2014)
M337V	45 jours (Devlin et al., 2015)	81% TUJ1 45% HB9 19% GFAP		-Hyper (J+21) puis hypoexcitabilité (J+49) -↓Courants Na ⁺ /K ⁺ voltage- dépendants (J+49) -Perte activité synaptique (J+49)	(Devlin et al., 2015) ^{&}
M337V Q343R	30jours (Fujimori et al., 2018)	60% HB9 Glie	-Agrégats pTDP-43 (J+5) -↓survie (J+10)	-renflements, ↓neurites (J+10) -↑Cytotoxicité, caspase (J+5) -↑ROS (J+15) -Perturbation mitochondriale (J+15) -Perturbation de la transcription (J+15)	(Fujimori et al., 2018) ^φ

Tableau 12 | Comparaisons des phénotypes de MNs dérivés d'iPSC porteurs de mutations au niveau du gène *TARDBP*. Différents protocoles ont été utilisés pour générer les cultures de MNs. Sont indiqués le protocole utilisé et le temps de différenciation, les différents pourcentages de neurones générés et les phénotypes mis en évidence (validation et nouveaux phénotypes) avec une estimation de l'apparition du phénotype à partir de la génération des MNs. ^φEtude transcriptomique, [&]indique deux publications d'un même groupe.

NOUVEAUX PHENOTYPES

Egawa et al. ont montré que dans des MNs porteurs de mutation *TARDBP*, les niveaux des ARNs NF-L et NF-M étaient diminués après une dizaine de jours de maturation (Egawa et al., 2012). Ceci est en accord avec les travaux publiés par *Chen et al.* sur les MNs porteurs de la mutation SOD1 A4V (Chen et al., 2014). La réduction de l'expression des sous-unités de NFs pourrait expliquer la diminution de l'arborisation dendritique qu'*Egawa et al.* ont observée (Egawa et al., 2012; Zhang et al., 2002).

Après deux semaines de maturation, *Alami et al.* ont montré que le transport axonal, notamment de l'ARNm des NF-L était perturbé dans les MNs mutants (Alami et al., 2014). Au même temps d'analyse, Fujimori et al. ont observé une dysfonction mitochondriale et une augmentation du stress oxydatif (Fujimori et al., 2018).

Quant à l'excitabilité des MNs porteurs de la mutation M337V, *Devlin et al.* ont montré qu'ils étaient hyperexcitables après une vingtaine de jours de maturation et que cette excitabilité diminuait avec le temps. De la même façon que les MNs porteurs d'expansions G4C2, la diminution des potentiels d'action était associée à une diminution progressive des courants Na⁺ et K⁺ voltage-dépendants (Devlin et al., 2015). Pour la même mutation, *Bilican et al.* ont noté que les taux des récepteurs NMDA, AMPA et GABA – responsables de la régulation de l'excitabilité neuronale au niveau des dendrites - étaient normaux (Bilican et al., 2012).

FUS

Six équipes différentes ont étudié des MNs porteurs de différentes mutations au niveau du gène *FUS* (**Tableau 13**). Chaque publication a utilisé son propre protocole, modifié à partir de ce qui avait été préalablement publié (Fujimori et al., 2018; Higelin et al., 2016; Ichiyangi et al., 2016; Lenzi et al., 2015; Liu et al., 2015; Naujock et al., 2016). Deux autres équipes ont brièvement étudié des mutations du gène *FUS* pour comparer les phénotypes qu'ils avaient observés dans les MNs porteurs de la mutation *SOD1* (Bhinge et al., 2017; Wainger et al., 2014). Toutes les études se sont concentrées sur des mutations affectant le domaine NLS de la protéine. La mutation la plus étudiée est la R521C. Un autre groupe a aussi étudié une mutation entraînant un décalage ribosomique en amont de cette région (Naujock et al., 2016; Naumann et al., 2018).

Mutation	Obtention MNs	Pureté	Validation	Nouveaux phénotypes	Référence
FUS M511FS, H517Q	24 jours (Boulting et al., 2011)	>97% TUJ1 <50% ISLET1		-Hyperexcitabilité (J+14)	(Wainger et al., 2014)
R521L, R521C, R495QfsX527	36 jours (Naujock et al., 2016)	85% TUJ1 65% ISLET1 25%CHAT		-↓Ratio Na ⁺ /K ⁺ (↓ Na ⁺) (J+7) -Hypoexcitabilité (J+7) -mRNA ↓ canaux Na ⁺ et ↑ K ⁺ (J+7) -↑UPR et marqueurs apoptotiques (J+7)	(Naujock et al., 2016) ^ε
R514S, R521C,	34 jours (Lenzi et al., 2015)	15% ISLET1	-FUS cytoplasmique (J+0) -Agrégats FUS (J+0)	-Vulnérabilité au stress oxydatif (J+0) -Granules de stress dépendent (J+0) de la délocalisation de FUS (J+0)	(Lenzi et al., 2015)

P525L	48 jours (Liu et al., 2015)	30% HB9	- Agrégats FUS (J+0) -FUS cytoplasmique (J+0)		(Liu et al., 2015)
H517D	44 jours (Imaizumi et al., 2015)	Pas de %	- Agrégats FUS (J+0) -Fus cytoplasmique (J+0)	-Dérégulation génique des progéniteurs (J-20) -Vulnérabilité au stress oxydatif, thermique et excitotoxique (granules de stress) (J+0)	(Ichiyanagi et al., 2016) & ^φ
R521C, R495QfsX527*, Asp502Thrfs^{Δ27}	28 jours (Stockmann et al., 2013)		- Agrégats FUS (J+21) -Fus cytoplasmique (J+21)	-Granules de stress dans neurites (J+42) -Dommages de l'ADN (J+21)	(Higelin et al., 2016)
R521C*, R521L, R495QfsX527	14 jours (Reinhardt et al., 2013)	50% (marqueur?)	-FUS cytoplasmique (J+16) -Renflements axonaux (J+16)	-Hypoexcitabilité (J+16) -Dommages de l'ADN (J+0)	(Naumann et al., 2018) ^ε
H517D	30jours (Fujimori et al., 2018)	60% HB9 Glie	-Agrégats FUS (J+5) -renflements (J+10) -↓neurites (J+10) -↓survie (J+10)	-↑Cytotoxicité, caspase (J+10) -↑ROS (J+15) -Perturbation mitochondriale (J+15) -Perturbation de la transcription (J+15)	(Fujimori et al., 2018) & ^φ

Tableau 13 | Comparaisons des phénotypes de MNs dérivés d'iPSC porteurs de mutations au niveau du gène *FUS*. Différents protocoles ont été utilisés pour générer les cultures de MNs. Sont indiqués le protocole utilisé et le temps de différenciation, les différents pourcentages de neurones générés et les phénotypes mis en évidence (validation et nouveaux phénotypes) avec une estimation de l'apparition du phénotype à partir de la génération des MNs. *Mutations corrigées, ^φEtude transcriptomique, & ou ^ε indiquent deux publications d'un même groupe.

VALIDATION

Dans les MNs dérivés d'iPSC, *FUS* a été observé comme étant agrégé et délocalisé dans le cytoplasme de façon plus ou moins importante en fonction de la mutation (Higelin et al., 2016; Ichiyanagi et al., 2016; Liu et al., 2015; Naumann et al., 2018). Ce phénotype reproductible semble plus fréquent que l'agrégation ou la délocalisation de la protéine SOD1 ou TDP-43 dans les MNs mutants dérivés d'iPSC.

Tout comme les MNs porteurs des expansions *C9ORF72* ou de mutations *TARDBP*, les MNs mutants *FUS* seraient plus vulnérables en situation de stress (Ichiyanagi et al., 2016; Naujock et al., 2016). Higelin et al. ont d'ailleurs rapporté que l'ADN des MNs mutants était endommagé, comme dans les MNs porteurs d'expansions *G4C2*, et ce même dans de jeunes MNs (Higelin et al., 2016).

NOUVEAUX PHENOTYPES

Plusieurs études ont montré que plus *FUS* était exclu du noyau en situation normale plus il était recruté dans des granules en situation de stress oxydatif (Fujimori et al., 2018; Ichiyanagi et al.,

2016; Lenzi et al., 2015), ce qui augmentait énormément la quantité de FUS extra-nucléaire (Lenzi et al., 2015a).

Ichiyaniagi et al. ont suggéré que la migration de FUS dans les granules de stress pourrait altérer l'expression des gènes et/ou leur épissage (Ichiyaniagi et al., 2016). En effet, ils ont montré que dès le stade de progéniteurs, l'expression de certains gènes était altérée par rapport aux contrôles. Ces dérégulations affectaient en majorité des gènes associés à la différenciation et au développement neuronal, comme le gène *NFASC* codant pour la Neurofascine, présentée précédemment ([Chapitre 3 p.61](#)) (Ichiyaniagi et al., 2016) suggérant un défaut développemental des MNs mutants.

Naujock et al. ont montré que dès la première semaine de maturation, les protéines telles que ATF4 ou BiP étaient augmentées suggérant que la réponse UPR était donc plus activée dans les MNs porteurs de mutations au niveau du gène *FUS* (comme dans les MNs *SOD1*) (Naujock et al., 2016). Ils ont aussi observé que les MNs étaient hypoexcitables. Ils déchargeaient moins de potentiels d'action spontanés et le ratio des courants Na⁺/K⁺ était diminué, ce qui est concordant avec la dérégulation des gènes associés aux canaux voltage-dépendants rapportée dans la même étude (Naujock et al., 2016).

Après la deuxième semaine de maturation, bien que *Naumann et al.* aient observé que les MNs mutants étaient toujours hypoexcitables, *Wainger et al.* ont montré que les MNs étaient hyperexcitables (Naumann et al., 2018; Wainger et al., 2014). Au même moment, *Fujimori et al.* ont mis en évidence une augmentation du stress oxydatif associé à des perturbations mitochondriales (Fujimori et al., 2018).

SLA sporadique

Quatre études indépendantes ont modélisé des formes SALS (Alves et al., 2015; Burkhardt et al., 2013; Fujimori et al., 2018; Imamura et al., 2017) (**Tableau 14**).

De façon intéressante, *Burkhardt et al.* ont montré que l'agrégation caractéristique de la protéine TDP-43 n'était pas retrouvée dans toutes les lignées de MNs issues de différents patients. Sur les 16 formes sporadiques étudiées, seulement 3 montraient une agrégation intranucléaire de TDP-43, soit moins de 20%. De façon surprenante, les MNs porteurs d'une mutation au niveau du gène *TARDBP* dans cette étude n'en possédaient pas. Par contre, ils ont retrouvé des agrégats TDP-43 dans des neurones du cortex moteur différenciés à partir de cellules de patients sporadiques dont les MNs avaient une agrégation de TDP-43. Les agrégats étaient phosphorylés et non ubiquitinylés, suggérant que la phosphorylation précédait l'ubiquitinylation (Burkhardt et al., 2013).

Obtention MNs	Pureté	Validation	Nouveaux phénotypes	Référence
45 jours (Chambers et al., 2009)	Inconnu	-Agrégats TDP-43		(Burkhardt et al., 2013)
20 jours (Hu and Zhang, 2009)	95% CHAT 95% HB9		-perturbation de la transcription (J+0)	(Alves et al., 2015) ^φ
7 jours (Hester et al., 2011)	62% HB9 Glie	-Agrégats TDP-43 (J+7) -↓survie (2/3) (J+7)		(Imamura et al., 2017)
30 jours (Fujimori et al., 2018)	60% HB9 Glie	-Atrophie (J+10) -Agrégats TDP-43, FUS ou SOD1 (J+10)	-ROS (J+15) -perturbation de la transcription (J+15)	(Fujimori et al., 2018) ^φ

Tableau 14 | Comparaisons des phénotypes de MNs dérivés d'iPSC issus de patients sporadiques. Différents protocoles ont été utilisés pour générer les cultures de MNs. Sont indiqués le protocole utilisé et le temps de différenciation, les différents pourcentages de neurones générés et les différents phénotypes mis en évidence (validation et nouveaux phénotypes) avec une estimation de l'apparition du phénotype à partir de la génération des MNs. ^φEtude transcriptomique.

En comparant les MNs issus de formes sporadiques aux MNs issus de formes familiales, *Fujimori et al.* ont pu démontrer que les MNs SALS avaient des phénotypes différents. Certains avaient des agrégats FUS, d'autres TDP-43 ou SOD1. De façon intéressante, l'apparition des phénotypes (atrophie, cytotoxicité, agrégats) était variable *in vitro*. Ainsi, ils ont montré qu'il était possible de regrouper les MNs dérivés d'iPSC-SALS par rapport à leurs caractéristiques *in vitro* ce qui était en corrélation plus ou moins étroite avec les caractéristiques cliniques des patients dont ils étaient issus (Fujimori et al., 2018).

De façon intéressante, mais sur seulement 2 patients SALS, *Alves et al.* ont montré l'importance de la fonction mitochondriale dans l'altération des MNs SLA en comparant les gènes différemment exprimés. Près de 1600 gènes étaient dérégulés dans les ARNm des MNs issus de patients SALS. Les ARNm KIF1A et KIF1C, responsables du transport mitochondrial étaient diminués. De plus, l'expression des protéines Dynéine et Dynactine associées au transport axonal étaient aussi perturbée (Alves et al., 2015).

2. LES ANALYSES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

Les publications ayant étudié l'excitabilité ont : soit étudié une seule forme familiale (Naumann et al., 2018; Selvaraj et al., 2018), soit comparé différentes formes de SLA entre elles (Devlin et al., 2015; Naujock et al., 2016; Wainger et al., 2014). Comme représenté sur le **tableau 15** ci-après,

les études électrophysiologiques ont été réalisées à des temps d'analyses différents. Comme décrit dans les paragraphes précédents, les MNs mutants sont démontrés être hypo- ou hyperexcitables en fonction du temps en culture. Les courants ioniques apparaissent aussi altérés. Même s'il est difficile de comparer les différentes publications, il semble clair que les MNs SLA ont des défauts d'excitabilité et cela renforce l'idée selon laquelle la comparaison des différentes mutations dans un même contexte expérimental est primordiale.

Mutations	Pureté	Current-clamp	Voltage-Clamp	Référence
<u>SOD1</u> A4V*, D90A, R115G	>97% TUJ1 <50%ISLET1	-Hyperexcitabilité (J+14, 28)	- ↓Courants K+ (J+28)	(Wainger et al., 2014)
	85% TUJ1	-Hypoexcitabilité (J+7)	-↓Ratio Na+/K+ (↓ Na+) (J+7)	(Naujock et al., 2016)
<u>C9ORF72</u>	>97% TUJ <50%ISLET	-Hyperexcitabilité (J+14)		(Wainger et al., 2014)
	81% TUJ, 45%HB9, 19%GFAP	- Hyper (J+21) puis hypoexcitabilité (J+49)	-↓Courants Na+/K+ voltage- dépendants (J+35) -Perte activité synaptique (J+49)	(Devlin et al., 2015)
	95% TAU, 50% ISLET1	-Pas de différence (J+7à35)		(Selvaraj et al., 2018)
<u>TARDBP</u> M337V	81% TUJ1, 45%HB9, 19%GFAP	-Hyper (J+21) puis hypoexcitabilité (J+49)	-↓Courants Na+/K+ voltage- dépendants (J+49) -Perte activité synaptique (J+49)	(Devlin et al., 2015)
<u>FUS</u> M511FS, H517Q, R521L, R521C R495QfsX527	>97% TUJ1 <50%ISLET1	-Hyperexcitabilité (J+14)		(Wainger et al., 2014)
	65% ISLET1, 25%CHAT	-Hypoexcitabilité (J+7)	-↓Ratio Na+/K+ (↓ Na+, ↑K+) (J+7)	(Naujock et al., 2016)

Tableau 15 | Comparaisons de l'excitabilité de MNs dérivés d'iPSC issus de patients FALS. Différents protocoles ont été utilisés pour générer les cultures de MNs. Sont indiqués les différents pourcentages de neurones générés, les résultats de *Patch-Clamp* obtenus avec une estimation de l'apparition du phénotype à partir de la génération des MNs. *Naumann et al.*, n'apparaît pas car ils font partie du même groupe que *Naujock et al.* (La conclusion était identique pour les mêmes mutations mais à J+16).

3. LES ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES

Dans neuf études, une analyse transcriptomique a été réalisée sur des MNs dérivés d'iPSC issues de patients SLA (Alves et al., 2015; Bhinge et al., 2017; Egawa et al., 2012; Fujimori et al., 2018; Ichianagi et al., 2016; Imamura et al., 2017; Kiskinis et al., 2014; Sareen et al., 2013; Selvaraj et al., 2018) (**Tableau 16**). Comme vu précédemment, les MNs ont été différenciés avec différents protocoles et la pureté et la quantité de MNs obtenus ne sont pas toujours connues. Afin de palier

à une faible génération de MNs, deux études ont réalisé au préalable un tri cellulaire sur des neurones transduits avec un vecteur exprimant la protéine RFP sous le promoteur HB9 (HB9::RFP). Le tableau ci-dessous présente des résultats obtenus, de façon non exhaustive, et classé en fonction du temps de différenciation après la naissance des MNs auquel ils ont été analysés.

Comparaisons	Protocole	Pureté	Dérégulations des gènes de:	Référence
<u>SOD1</u>^{L144FVX} et contrôles	<u>J+7</u> FACS (HB9::RFP) Single-Cell	62% HB9 Glue	↑ TCA/chaîne respiratoire	(Imamura et al., 2017)
<u>SOD1</u>^{E100G} et contrôle isogénique	<u>J+16</u> « jeunes » MNs	>70% ISLET1	- Ségrège par génotype - ↑Activation p53, UPR, cycle cellulaire, activation AP1 - ↓Mitochondrie, ATP synthase, Phosphorylation Oxydative, ↓GABA-R → Implication de la voie ERK/JNK	(Bhinge et al., 2017)
<u>SOD1</u>^{A4V} et contrôle isogénique	<u>J+30</u> 15 jours avec glie, FACS (HB9::RFP) + 15 jours	>97% TUJ1 <50% ISLET1 Glue	- Ségrège par génotype - Transport (cytosquelette, ↑Kinésines), Fonction mitochondriale, stress oxydatif, Transcription/Traduction, Réponse UPR	(Kiskinis et al., 2014)
<u>C9ORF72</u>^{(G4C2)n} et contrôles dont isogéniques	<u>J+21</u>	95% TAU 50% ISLET1	- ↓Transmission synaptique, - ↑Métabolisme ARN, transport nucléaire et ioniques (dont GluA1, permeable Ca2+)	(Selvaraj et al., 2018)
<u>C9ORF72</u>^{(G4C2)n} et contrôles	<u>J+48</u>	55,5% SMI32 66,5% TUJ1 25% GFAP progéniteurs	- Ségrège en fonction du nombre d'expansions - Adhésion cellulaire, transmission synaptique	(Sareen et al., 2013)
<u>TARDBP</u>^{M337V, Q343R, G298S} et contrôles	<u>J+10</u>	80% HB9 Glue	- Métabolisme de l'ARN (TDP43), granules de stress (TIA1), transport nucléaire, NFs (NFL/M)	(Egawa et al., 2012)
<u>FUS</u>^{H517D} et contrôles	<u>Progéniteurs</u>	INCONNU	- Différenciation neurale, adhésion cellulaire, phosphorylation oxydative, import des canaux K+ (dont NFASC)	(Ichiyanagi et al., 2016)
SALS et contrôles	<u>J+0</u> « jeunes » MNs	95% CHAT 95% HB9	- Mitochondrie (dont CytC, VDAC), phosphorylation oxydative, trafic intracellulaire (dont KIF1C), lysosome	(Alves et al., 2015)
<u>SOD1</u>^{H46R, H43R} <u>TARDBP</u>^{M337V, Q343R,} <u>FUS</u>^{H517D} <u>SALS</u>	<u>J+15</u>	60% HB9 Glue	- FALS : Ségrège par génotype, dégradation des NT, dopamine, mitochondrie - FUS : Inflammation, synthèse des cathécolamines - TDP : AIS, actine, apoptose, potentiel d'action, transcription	(Fujimori et al., 2018) ^φ

Tableau 16, p.87 | Comparaisons des résultats d'analyses transcriptomiques de MNs dérivés d'iPSC issus de patients FALS et SALS. Différents protocoles ont été utilisés pour générer les cultures de MNs. Sont indiqués le temps de différenciation après la naissance des MNs auquel l'analyse transcriptomique a été réalisée, les différents pourcentages de neurones générés, et les résultats obtenus.

La quasi-totalité des publications ne compare qu'une seule forme de SLA par rapport aux contrôles. Seule une étude de 2018 a comparé des MNs issus de patients SALS et FALS porteurs de mutations différentes (Fujimori et al., 2018). Les MNs ont tous été comparés à un seul temps de différenciation : soit une comparaison entre progéniteurs de MNs (Ichihanagi et al., 2016), soit entre « jeunes » MNs (Alves et al., 2015; Egawa et al., 2012; Fujimori et al., 2018; Imamura et al., 2017), ou soit entre MNs plus matures, après plus de deux semaines de maturation (Bhingre et al., 2017; Kiskinis et al., 2014; Sareen et al., 2013; Selvaraj et al., 2018). Ces analyses transcriptomiques ont permis de montrer des dérégulations de gènes liés aux phénotypes observés des MNs de patients. Malheureusement, parce que les protocoles, la pureté, les temps d'analyses et choix d'analyses ne sont pas les mêmes, il est difficile de comparer les résultats de ces différentes études entre eux. Quant à l'étude de *Fujimori et al.* qui compare différentes formes de SLA entre elles, la présence de glie ne permet pas de conclure si les différences observées sont uniquement intrinsèques aux MNs (Fujimori et al., 2018).

4. CONCLUSION

En conclusion, les différents protocoles utilisés dans ces travaux susmentionnés ne donnent pas des cultures avec les mêmes pourcentages de MNs et le temps d'analyse n'étant pas le même, il est difficile de les comparer. Malgré tout, ces travaux ont permis de démontrer qu'il était possible de modéliser la SLA à l'aide de MNs dérivés d'iPSC. En effet, ce qui avait déjà été décrit dans les tissus *post-mortem* de patients a été retrouvé dans des MNs dérivés d'iPSC porteurs de différentes formes de SLA, bien qu'ils gardent un phénotype « jeune » (Mertens et al., 2015). De plus, de nouvelles hypothèses ont pu émerger. La **figure 23** tente d'établir une chronologie des phénotypes observés, sans tenir compte des mutations mais seulement des gènes mutés et la **figure 24** résume les phénotypes communs découverts à ce jour. Ainsi, il semble que la formation d'agrégats protéiques, un stress des MNs, des altérations des fonctions mitochondriales, des perturbations transcriptionnelles et des défauts électrophysiologiques soient des défauts communs entre toutes les formes de SLA. Mais leurs chronologies sont peu concordantes ce qui ne permet pas de distinguer un évènement qui pourrait expliquer spécifiquement la dégénérescence des MNs de patients SLA dans toutes ses formes.

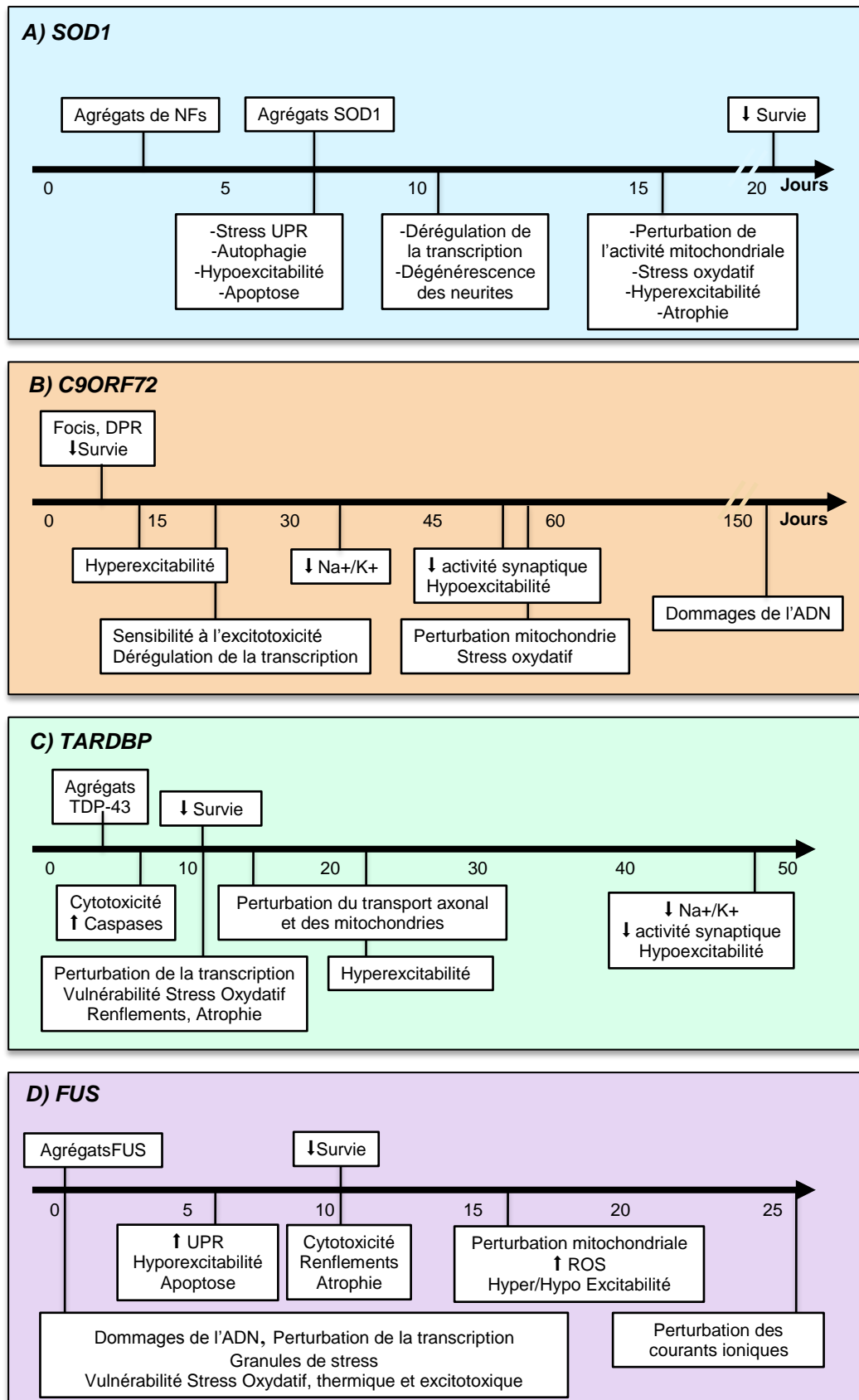


Figure 23 | Phénotypes observés dans des MNs dérivés d'iPSC porteurs de mutations au niveau du gène SOD1 (A), C9ORF72 (B), TARDBP (C) et FUS (D) en fonction du temps. Les phénotypes sont indiqués au temps le plus précoce auquel ils ont été observés. Les encadrés au-dessus de la flèche concernent les phénotypes déjà observés dans les tissus *post-mortem*. Les encadrés du dessous représentent les nouveaux mécanismes mis en évidence.

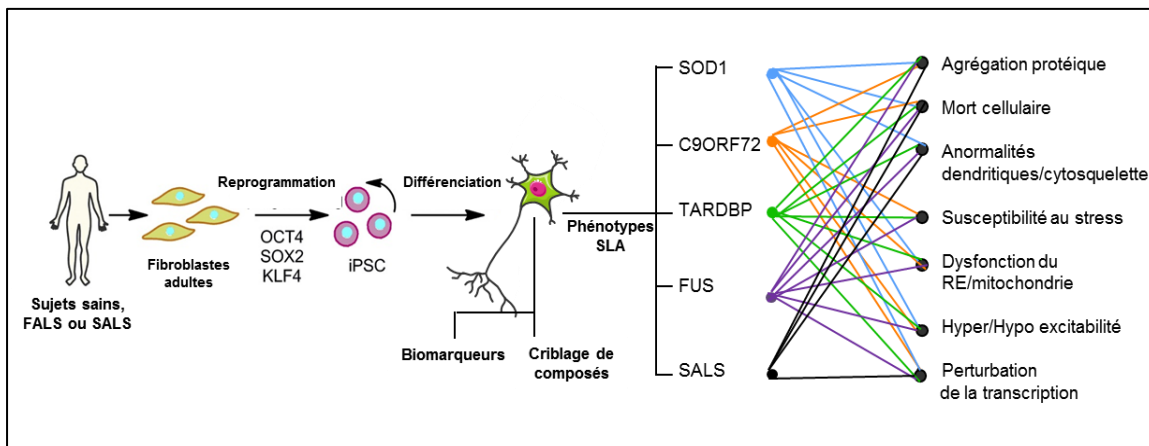


Figure 24 | Découverte des mécanismes communs de la pathogénèse de la SLA via des MNs dérivés d'iPSC issues de formes familiales et sporadiques. Après la reprogrammation de fibroblastes en iPSC, la différenciation en MNs a permis de mettre en évidence des mécanismes communs aux différentes formes de SLA et de cribler des composés à visée thérapeutique de façon patient-spécifique. Cela pourrait aussi permettre de découvrir de nouveaux biomarqueurs. (Modifiée et actualisée d'après *Matus et al., 2014*) Réimprimée avec la permission d'*Elsevier Inc.* via le Copyright Clearance Center Licence No 4421891235216.

CHAPITRE 5 : THERAPIE DE LA SLA

En permettant de modéliser la pathologie de n'importe quel individu atteint de SLA tout en gardant leur fond génétique, les MNs dérivés d'iPSC permettent une étude de toutes les formes de SLA alors que les modèles animaux ne représentent qu'une faible fraction des patients.

Seront d'abord présentés dans ce chapitre les différents essais cliniques qui ont été lancés avec l'espoir de ralentir la progression de la SLA et les mécanismes qui ont été visés par chacun d'entre eux. Enfin sera exposé pourquoi les MNs dérivés d'iPSC pourraient permettre de cribler et d'accélérer le développement des molécules thérapeutiques en surmontant l'hétérogénéité de la pathologie.

I. LES ESSAIS CLINIQUES DE LA SLA

Plusieurs étapes séparent la découverte d'un composé de la mise sur le marché (**Fig. 25**). En moyenne, près de 10 ans sont nécessaires pour le développement des médicaments du SNC (Augustine et al., 2013). Après les études précliniques qui mènent à la découverte d'une molécule d'intérêt potentiel, les premières phases sont exploratrices et permettent d'évaluer la pharmacocinétique et la toxicité. La phase III est l'essai définitif à l'issue duquel les agences du médicament (Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux, FDA ; Agence

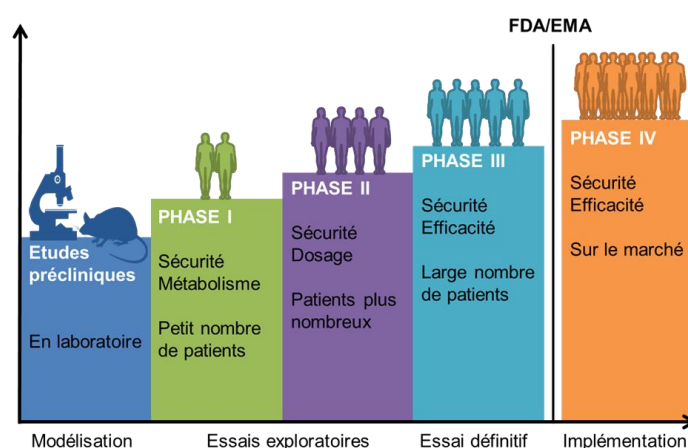


Figure 25 | Les essais cliniques. Avant de passer chez l'homme, les nouvelles molécules sont testées *in vitro* et/ou dans des modèles animaux. La première phase permet d'évaluer comment le corps métabolise le composé chimique. Toutes les phases surveillent de près la sécurité et les effets secondaires de l'intervention. La phase I, permet de vérifier la toxicité de la molécule. La phase II, avec un nombre de patients plus important permet d'évaluer la toxicité et le dosage optimal. Enfin, la phase III permet d'évaluer l'efficacité statistique du composé sur un plus large nombre de patients. Après cette phase décisive, les agences du médicament donnent ou non leur accord à la mise sur le marché et à la poursuite de l'évaluation du traitement à grande échelle (Campbell, 2000).

européenne des médicaments, EMA) donneront ou non leur accord à une mise sur le marché si l'essai est positif. La phase IV est donc une étude constante de l'efficacité et de la toxicité du médicament à plus grande échelle (Campbell, 2000).

Le site internet de l'institut national de Santé des Etats-Unis (NIH) «www.clinicaltrials.gov», répertorie depuis les années 2000 une majeure partie des essais cliniques du monde entier issus de fonds privés ou publics. J'ai donc analysé les essais répertoriés concernant la SLA en ciblant les essais incluant plus de 20 patients de la phase II à la phase IV jusqu'en juin 2018 dont les données étaient accessibles (**Fig. 26**). Plusieurs paramètres ont été pris en compte dont le type d'intervention et son mécanisme ciblé, les critères d'inclusions et d'exclusions, le nombre de participants, les dates de début ou de fin, les paramètres d'évaluation (ALSFRS¹⁸, SVC, FVC¹⁹, survie), et le résultat de l'essai si disponible.

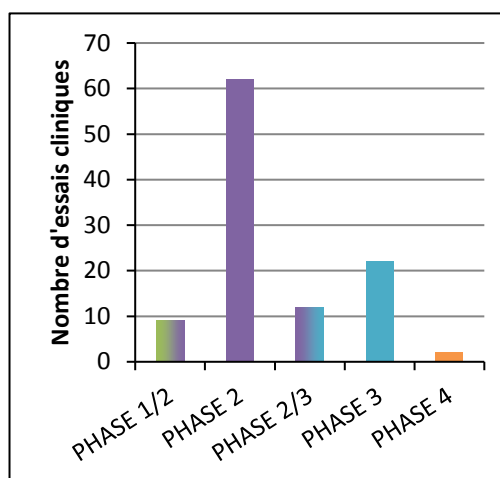


Figure 26 | Nombre d'essais cliniques par phase entrepris depuis les années 2000. La plus grande partie des essais sont de phase II.

L'objectif premier était de comprendre quels mécanismes avaient été visés jusqu'à présent et si l'hétérogénéité des patients était prise en compte dans les critères d'inclusions et d'analyses. Depuis 2001, près d'une centaine d'essais cliniques à visée curative ont été entrepris, seulement 1 composé est actuellement en phase IV (Riluzole) et 9 sont en phase III (**Fig. 27**).

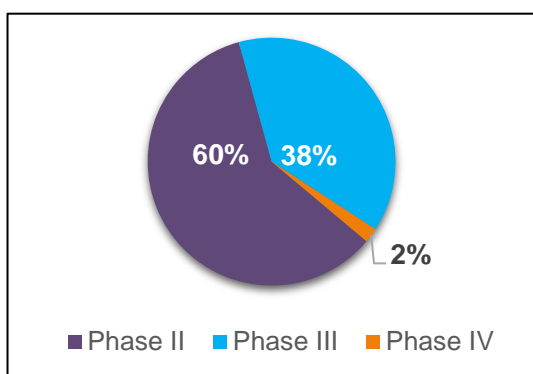


Figure 27 | Proportions de composés testés par phase. 52 composés ont été testés : 31 composés sont en phase II, 20 sont arrivés en phase III et 1 est en phase IV.

Non curatif, le Riluzole est toujours l'unique traitement dont l'effet ait été prouvé sur le long terme (Miller et al., 2007b). L'Edaravone, un anti-oxydant, a récemment reçu l'approbation de la FDA et devrait rentrer en phase IV (Robinson, 2017). Malheureusement, son efficacité resterait moindre et son effet sur une mineure partie de patients font qu'elle n'est pas beaucoup prescrite, d'autant plus que son mode d'administration en intraveineuse reste très invasif (Lee et al., 2018; Oskarsson et al., 2018). Le Mexilitine est pour l'instant en phase IV (Weiss et al., 2016) pour son action symptomatique

contre les crampes, mais un essai de phase II est actuellement en cours pour évaluer son efficacité

¹⁸ ALS-FRS = ALS Functional Rating Scale permet évaluer la progression de l'atteinte motrice des patients SLA (Tao and Wu, 2017)

¹⁹ SVC = Slow Vital Capacity, FVC = Forced Vital Capacity permettent d'évaluer les fonctions pulmonnaires (Pinto and de Carvalho, 2017)

sur la survie (NCT02781454). Pour rappel, le Mexilétine est un inhibiteur des courants Na⁺ voltage-dépendants suggéré par une équipe japonaise à l'issue des études d'excitabilité des MNs spinaux (cf. Chapitre 3).

Hormis le Riluzole, une vingtaine de composés ont dépassé la phase II (**Fig. 26**) qui compte le plus d'essais cliniques. Parmi ceux dont les résultats sont publiés, seulement l'Edaravone avait une réponse thérapeutique positive sur un ralentissement de l'aggravation de l'échelle ALS-FRS pour certains patients. 52% (11) des composés testés en phase III n'ont donc pas rempli les effets critères de succès. 43% (9) sont encore en cours ou en attente de résultats. Parmi les composés de phase II dont les résultats sont déjà publiés, 7 (44%) devraient passer en phase III, 9 (56%) se sont conclus par des échecs.

Les composés testés ciblent pourtant les différents mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la SLA : l'excitotoxicité, le stress oxydatif, le métabolisme énergétique et protéique, l'inflammation. Certains visent à protéger le neurone ou le muscle. D'autres ciblent le génome ou plusieurs mécanismes à la fois. Le tableau ci-dessous présente les différents composés testés de la phase II à la phase IV en fonction des mécanismes qui ont été ciblés (**Tableau 17**).

Phase	Composé	Mécanisme ciblé	Nombre de patients	Résultat	Référence
Anti-Excitotoxique					
I/II	Lacosamide	Inactivation des canaux Na ⁺ voltage-dépendants	30	En cours	NCT03186040
II	Talampanel	Antagoniste du récepteur AMPA	559	Echec	(Pascuzzi et al., 2010)
II	Mexilétine	Blocage des canaux Na ⁺	60	✓FDA** (crampes***)	(Weiss et al., 2016)
II	Retigabine	Ouverture des canaux K ⁺	192	OK (+/-)*	(Kovalchuk et al., 2018).
II/III	Memantine	Blocage des récepteurs NMDA	63	OK (+/-)*	(de Carvalho et al., 2010)
III	Ceftriaxone	↑ Activité EAAT2	513	Echec	(Cudkowicz et al., 2014)
IV	Riluzole	Inhibe relargage du glutamate	414	✓FDA** ✓EMA**	(Bensimon et al., 1994)
Anti-Oxydant					
II	Coenzyme Q10	↑ Propriétés antioxydatives	185	Echec	(Kaufmann et al., 2009)
II	Rasagiline	Inhibiteur de la MAO-B	252	OK (+/-)*	(Macchi et al., 2015)

II	Lunasin Regimen	Vitamines, antioxydants, CoQ10, Créatine	50	En attente	NCT02709330
II/III	Deferiprone	Chélateur de fer	210	En cours	NCT03293069
III	Vitamine E	Supplément anti-oxydant	160	Echec	(Graf et al., 2005)
III	Edaravone	↑ Propriétés antioxydatives	206	✓ FDA**	(Group MCI-186, 2017)
Neurotrophique/Neuroprotecteur					
III	IGF-1	Facteur de croissance	330	Echec	(Sorenson et al., 2008)
III	NurOwn® (MSC-NTF cells)	Autogreffe de MSC pour sécréter des NTFs	200	En cours	NCT03280056
III	Vitamine B12	Supplément neurotrophique	128	En cours	NCT03548311
II/III	TCH346	Anti-apoptotique via inhibition GAPDH	591	Echec	(Miller et al., 2007a)
II	Ozanezumab	Anticorps contre NOGO-A (<i>neurite outgrowth inhibitor</i>)	304	Echec	(Meininger et al., 2017)
II	TUDCA	Anti-apoptotique	34	OK ↓ de la progression	(Elia et al., 2016)
Métabolisme énergétique					
II	Creatine	↑ Production ATP	107	Echec	(Rosenfeld et al., 2008)
III	Dexpramipexole	↑ Fonction mitochondriale	943	Echec	(Cudkowicz et al., 2013)
II/III	Olesoxime	Inhibe ouverture mPTP	512	Echec	(Lenglet et al., 2014)
II	Vitamine H	↑ Production ATP	30	En cours	NCT03427086
II	RNS60	↑ Production ATP	140	En cours	NCT02988297
inflammation					
I/II	hGRPs	Transplantation par injection hGRP, Remplacement des astrocytes	30	En cours	NCT02478450
II	Celecoxib	Inhibe synthèse prostaglandine	200	Echec	(Cudkowicz et al., 2006)
III	Minocycline	Antibiotique	400	Echec	(Gordon et al., 2007)
II	Thalidomide	Modulation des cytokines	40	Echec	(Meyer et al., 2008)
II	Glatiramer acetate	Immunomodulateur	366	Echec	(Meininger et al., 2009)

II	Pioglitazone	Agoniste des récepteurs PPAR-γ	219	Echec	(Dupuis et al., 2012)
II	Fingolimod	Antagoniste des récepteurs S1P	30	OK (+/-) *	(Berry et al., 2017)
II	Immunosuppression	Basiliximab, Tacrolimus, Mycophenolate, et Prednisone	31	OK (+/-) *	(Fournier et al., 2018)
II	Ibudilast	Inhibe phosphodiesterase	71	En attente	NCT02238626
II	Tocilizumab	Inhibe récepteur IL-6	22	En attente	NCT02469896
II	Hormone corticotrope	Module cytokines	213	En cours	NCT03068754
II	IC14	Anticorps contre CD14	50	En cours	NCT03508453
II	IL-2	Survie des lymphocytes T	216	En cours	NCT03039673
II/III	G-CSF	Stimule la production de granulocytes	40	Echec	(Amirzagar et al., 2015)
III	Masitinib	Cible les mastocytes et macrophages	406	☒ EMA refus	(EMA, 2018)
Homéostasie protéique					
III	Lithium	↑ Autophagie	243	Echec	(UKMND-LiCALS Study Group, 2013)
III	Arimoclomol	↑ HSP	231	En cours	NCT03491462
Muscle					
II	Pimozide	Stabilise transmission neuromusculaire	100	En cours	NCT03272503
III	Levosimendan	Stabilise la liaison troponine C/Ca ²⁺	450	En cours	NCT03505021
III	Tirasemtiv	Activateur de la troponine du muscle squelettique rapide	743	En attente	NCT02496767
Génomique					
I/II	Sodium phenylbutyrate	Inhibe histone déacétylase	40	OK (+/-)*	(Cudkowicz et al., 2009)
I/II	Pyrimethamine	Inhibe gène SOD1	32	En attente	(Lange et al., 2017)
II	Antiretroviral (Triumeq)	Inhibe intégrase et transcriptase inverse	40	En cours	NCT02868580
III	Sodium Valproate	Inhibe histone déacétylase	165	Echec	(Piepers et al., 2009)

Multiple					
I/II	Pioglitazone +Tretinoïne	- Anti-inflammatoire - Neuroprotecteur	27	Echec	(Levine et al., 2012)
II	Creatine +Celocoxib /Minocycline	- Protection mitochondrie - Anti-inflammatoire	60	OK (+/-)*	(Gordon et al., 2008)
II	Phenylbutyrate +TUDCA	- Inhibe histone deacetylase - Anti-apoptotique	132	En cours	NCT03127514
II	Lithium +Valproate	- Homéostasie protéique - Inhibe HDAC6	40	En cours	NCT03204500

Tableau 17 | Les différents composés testés de la phase II à la phase IV classés en fonction des mécanismes ciblés. * Ne sont pas toxiques mais nécessitent des études supplémentaires pour observer un résultat sur la survie ou la progression. ** ✓ ou ☒ Autorisation ou refus des agences du médicament pour une mise sur le marché. *** Le mexilétine a reçu l'autorisation de la FDA pour son action contre les crampes. (MSC, cellules stromales mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse ; NTFs, facteurs neurotrophiques ; hGRP, Human Glial Restricted Progenitor Cells, Clinicaltrials.gov).

Bien que la plupart des mécanismes décrits dans la pathologie aient été ciblés, des fois plusieurs en même temps, la majorité des essais cliniques ont échoué du fait de leur toxicité ou de leur inefficacité. Cela peut s'expliquer par plusieurs raisons dont :

- Une intervention trop tardive. Dans plus de 30 essais cliniques, le temps depuis l'initiation de la pathologie n'a pas été pris en compte alors que c'est un paramètre important puisque les premières faiblesses pourraient être déjà signes que certains MNs sont morts ou dysfonctionnels, d'autant plus qu'aucun biomarqueur diagnostique précoce permettant d'inclure plus rapidement des patients n'est pas encore disponible. Or, plus le temps passe, plus la dégénérescence peut s'aggraver et plus la chance de protéger les MNs s'amoindrir.
- L'absence de biomarqueur prédictif, pharmacodynamique et évolutif qui peut freiner le développement de stratégies thérapeutiques plus efficaces (Benatar et al., 2016) ([cf.p.26](#)).
- Des essais sur des populations SLA trop hétérogènes. Les essais thérapeutiques ne ciblent pas des sous-populations plus homogènes de SLA. La grande majorité des essais ont exclu les individus atteints d'une SLA-DFT. Deux essais se sont focalisés sur des formes familiales dont un spécifiquement sur des patients porteurs de la mutation au niveau du gène *SOD1* (Pyrimethamine, NCT01083667 ; Ariclomol, NCT00706147). Quatre ont inclus uniquement des patients SALS (Mexilétine, NCT02781454 ; GCSF, NCT01825551, Triumeq, NCT02868580, Rpramipexole NCT00140218). Le fait que l'Edaravone ait été positif avec une ré-analyse sur une sous-population de patient est un indice qui va dans ce sens (Takahashi et al., 2017).

- La limite des modèles (*in vitro* et *in vivo*) dans lesquels les molécules sont préalablement testées.

II. LES MOTONEURONES DERIVES DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES HUMAINES POUR CRIBLER DES MOLECULES A VISEE THERAPEUTIQUE

Les études publiées sur les iPSC montrent qu'il est possible de modéliser la SLA *in vitro* puisqu'y sont retrouvés des signes majeurs de la SLA (cf. [Chapitre 4](#)). Neuf articles ont utilisé les MNs dérivés d'iPSC issus de patients SLA comme plateforme pour cribler différentes molécules afin d'identifier des composés capables d'augmenter la survie des MNs et 3 études ont testé des molécules spécifiques pour restaurer un phénotype anormal. Le **tableau 18** ci-dessous présente les différentes études ayant testé des molécules à visée thérapeutique.

Egawa et al., qui avaient observé une perturbation de la transcription, ont testé 4 composés pouvant la moduler (Egawa et al., 2012). En plus de protéger les MNs suite au stress oxydatif induit par l'arsénite, l'acide anacardique, un inhibiteur d'histone acetyltransférase, a corrigé certaines perturbations transcriptionnelles en réduisant l'induction des voies NFκB et TNFα qui étaient augmentées dans les MNs mutants *TARDBP*, ainsi qu'en réduisant l'ARNm de TDP-43 et en augmentant l'ARNm de NF-M (Egawa et al., 2012). Deux essais cliniques ont notamment eu pour cible l'acétylation des histones (Cudkowicz et al., 2009; Piepers et al., 2009) mais les essais ont été soit un échec, soit avec un effet limité. Il aurait pu être intéressant de tester ces molécules (Sodium Valproate et Sodium phénylburate) sur des MNs dérivés d'iPSC ou de pouvoir cibler des patients mutés au niveau du gène *TARDBP*.

MNs	Criblage	Composé candidat	Effet	Référence
<i>TARDBP</i> (Q343R, M337V, G298S)	4	Acide Anacardique (inhibe histone acetyltransférase)	-↓Induction voie NFκB et TNFα -↓ARNm TDP-43 et ↑ ARNm NF-M -↑Neurites -↑Survie suite au stress oxydatif	(Egawa et al., 2012)
<i>SOD1</i> (L144F) <i>TARDBP</i> (M337V)	5000	Kenpaullone	-↑Survie suite à un stress induit par le retrait de NTFs	(Yang et al., 2013)
<i>C9ORF72</i> (G4C2)n	non	ASOs contre l'ARNm de <i>C9ORF72</i>	-Suppression des <i>foci</i> d'ARNs -Restaure défauts transcription (DPP6, CBLN2, CBLN1, CBLN4, SLITRK2)	(Sareen et al., 2013)

C9ORF72 (G4C2)n	non	Vitamine E	-↓Stress oxydatif et la fragmentation de l'ADN	(Lopez-Gonzalez et al., 2016)
SALS	1757	Inhibiteurs de CDK et JNK Triptolide, Digoxin LanatosideC, ProscillaridinA	- ↓Agrégats TDP-43	(Burkhardt et al., 2013)
SOD1 (A4V, D90A, G85S) C9ORF72 (G4C2)n FUS (M511FS, H517Q)	non	Retigabine (active Kv7)	-↓Stress du RE (XBP1s) -Bloque hyperexcitabilité -↑Survie (SOD1 A4V)	(Wainger et al., 2014)
SOD1 (A4V) FUS (R495Q)	non	4-AminoPyridine (bloque canaux K+)	-Restaure hypoexcitabilité -↓Caspase 3	(Naujock et al., 2016)
SOD1 (L144FVX, G93S) C9ORF72 TARDBP (M337V, Q343R, G298S) SALS	1416	Bosutinib	<u>SOD1^{L144FX}</u> - ↓Phosphorylation Src/c-Abl -Restaure niveau de p62 et stimulerait l'autophagie -Restaure le niveau d'ATP <u>FALS et 2/3 SALS</u> -↑Survie, ↓ agrégats	(Imamura et al., 2017)
SOD1 (H46R, H43R) TARDBP (M337V, Q343R) FUS (H517D) SALS	1232	Ropinorole (agoniste de récepteur dopaminergique)	<u>FALS</u> : Restaure activité mitochondriale -↓Agrégats, caspase 3, cytotoxicité, ROS, atrophie (non-SOD1 MNs) <u>SALS</u> : ↓ Agrégats, cytotoxicité, ROS, atrophie (16/22, « non-SOD1 modèle »)	(Fujimori et al., 2018)

Tableau 18 | Les différentes études ayant testées des molécules à visée thérapeutique dans les MNs dérivés d'iPSC. Seule la Rétigabine a pour l'instant abouti à un essai clinique (NCT02450552).

Rubin et al. ont criblés près de 5000 composés sur des MNs dérivés de souris^{G93A} en comparant leur survie lors d'un stress induit par le retrait de NTFs nécessaires à leur survie (Yang et al., 2013). Parmi les composés se trouvaient l'Olexime et le Dexpramipexole qui venaient d'échouer en phase III (Cudkowicz et al., 2013; Lenglet et al., 2014). Ils ont découvert que la Kenpaullone, un inhibiteur de GSK3²⁰, améliorerait fortement la survie des MNs SLA et ce plus que l'Olexime et le Dexpramipexole. En plus d'améliorer la survie suite au retrait de NTFs, la Kenpaullone améliorerait aussi la survie en situation de stress induit par l'inhibition de Pi3k (impliquée dans la régulation de

²⁰ Impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, dont la stabilité des MTs (Cho and Johnson, 2004).

la survie neuronale) et diminuait la quantité de protéine SOD1 mutée. Ils ont aussi démontré que la Kenpaullone promouvait la survie de MNs dérivés d'iPSC issues de patients porteurs de la mutation SOD1^{L44F} tout comme l'Olexime mais pas le Dexamipexole. Aucun de ces trois composés n'améliorait la survie des MNs dérivés de patients TARDBP^{M337V}, si ce n'est la Kenpaullone dans une seule lignée. Ces résultats ont suggéré qu'il était possible d'utiliser les MNs dérivés de cellules souches pour identifier des composés candidats et surtout de comprendre les effets de distinctes molécules sur les différentes formes de SLA pour améliorer la découverte de meilleurs traitements de façon patient-spécifique (Yang et al., 2013).

Trois autres équipes ont réalisé un criblage de composés sur plusieurs formes de SLA et ont trouvé plusieurs molécules qui diminuaient les agrégats TDP-43 : des inhibiteurs de cyclines kinase, des glycosides cardiaques (Burkhardt et al., 2013), le Bosutinib (Imamura et al., 2017) et le Ropinirole (Fujimori et al., 2018). *Imamura et al.* ont observé que le Bosutinib protégeait les MNs issus de patients SLA porteurs de différentes mutations au niveau du gène *SOD1*, *TARDBP* et *C9ORF72* ainsi que des MNs dérivés de patients SALS. Ils ont montré qu'il agissait en inhibant la voie Src/c-Abl, ce qui activait l'autophagie et la dégradation des protéines mal conformées. En plus de diminuer TDP-43 dans les iPSC issues de patients SALS ou de patients mutés au niveau du gène *TARDBP*, il a été montré qu'il pouvait aussi réduire la quantité de DPR dans les MNs porteurs d'expansions G4C2 (Imamura et al., 2017).

Très récemment, le Ropinirole a été étudié sur des MNs dérivés d'iPSC et s'est montré beaucoup plus efficace que le Riluzole, l'Edaravone ou d'autres composés déjà testés dans des essais cliniques infructueux (Ceftriaxone, Dexamipexole). Outre la diminution des agrégats TDP-43 des MNs issus de patients mutants *TARDBP* ou SALS, l'étude a montré qu'il pouvait aussi diminuer les agrégats FUS des MNs porteurs de mutation *FUS*. De plus, il pouvait diminuer les anomalies mitochondriales dans les MNs issus de patients FALS. De façon intéressante, ils ont observé que le Ropinirole protégeait les MNs mutants *FUS* et *TARDBP* contre l'atrophie, le stress oxydatif et l'apoptose mais pas les MNs mutés au niveau du gène *SOD1*, dont il ne diminuait pas non plus les agrégats présents. En outre, il protégeait aussi les MNs SALS dont le phénotype ne se rapprochait pas de celui des *SOD1*. Ces résultats ont suggéré que les MNs porteurs des mutations *FUS* et *TARDBP* étaient affectés par des mécanismes différents que les MNs porteurs des mutations *SOD1*, de la même façon que différents mécanismes devaient aussi être impliqués dans les différents MNs issus de patients SALS ayant des pathologies différentes (Fujimori et al., 2018).

En outre, *Sareen et al.* ont montré qu'il était aussi possible d'utiliser des oligonucléotides anti-sens (ASOs) pour supprimer les ARNs *foci* présents et corriger certaines perturbations transcriptionnelles induites par les expansions dans les MNs *C9ORF72* (Sareen et al., 2013). Les résultats d'un essai clinique de phase I administrant en intrathécal des ASOs dirigés contre l'ARNm de *SOD1* pour des individus porteurs d'une mutation au niveau du gène *SOD1* a d'ailleurs montré que l'utilisation d'ASOs n'était pas toxique et que cette technique pouvait être utilisée à des fins thérapeutiques (Miller et al., 2013).

Wainger et al. et Naujock et al., qui avaient démontré respectivement que les MNs dérivés d'iPSC SLA étaient hyperexcitables ou hypoexcitables ont pu renverser le phénotype observé en utilisant des composés déjà validés par la FDA (Naujock et al., 2016; Wainger et al., 2014): la Rétigabine qui bloque l'hyperexcitabilité et améliore la survie en activant les canaux K⁺ voltage-dépendants et la 4-Aminopyridine qui augmente l'excitabilité en les bloquant. Alors que la Rétigabine n'a pas été testé précliniquement dans les animaux modèles SLA, elle a été testée directement dans un essai clinique de phase II (NCT02450552) où les patients étaient suivis par les techniques de TTNCS et TMS (cf. p.54). Elle devrait passer en phase III d'ici peu car l'étude a montré que la Rétigabine a un effet sur l'excitabilité des nerfs périphériques mais de nouveaux essais sont nécessaires pour conclure quant à son efficacité thérapeutique sur le long terme (Kovalchuk et al., 2018).

En récapitulant l'hétérogénéité clinique et génétique des patients atteints de SLA *in vitro*, les MNs dérivés d'iPSC représentent un bon modèle préclinique pour la découverte ou le repositionnement de molécules thérapeutiques. La variabilité des phénotypes mis en exergue et les réponses différentes aux traitements pharmacologiques suggèrent que l'initiation de la cascade des mécanismes mis en jeu dans la physiopathologie de la SLA pourrait être différente suivant les patients. Analyser de façon patient-spécifique les mécanismes impliqués dans la dégénérescence des MNs pourrait permettre de classer les individus atteints de SLA dans des sous-groupes pour améliorer la stratégie thérapeutique et rendre possible une médecine plus personnalisée.

CHAPITRE 6 : LES OBJECTIFS

L'objectif principal de ma thèse a été de comparer des MNs humains issus de patients avec différentes formes de SLA, dans un même contexte expérimental afin d'identifier des mécanismes intrinsèques aux MNs communs ou divergents entre les différentes formes.

Lorsque j'ai commencé ma thèse, le groupe de Delphine Bohl avait déjà généré des iPSC à partir de fibroblastes de deux patients porteurs d'expansions G4C2 dans le gène *C9ORF72*, d'un patient porteur de la mutation *SOD1*^{N139D}, et d'un patient porteur de la mutation *TARDBP*^{G348C}. Ces deux dernières mutations n'ont jusqu'à présent jamais été étudiées dans ce modèle.

Les premiers travaux publiés concernant des MNs dérivés d'iPSC issues d'individus atteints de SLA datent de 2012 et étudiaient des MNs porteurs des mutations au niveau des gènes *SOD1*, *C9ORF72*, *TARDBP* et *FUS*. A mon arrivée deux ans plus tard, huit papiers avaient été publiés (Alami et al., 2014; Bilican et al., 2012; Burkhardt et al., 2013; Chen et al., 2014; Egawa et al., 2012; Kiskinis et al., 2014; Sareen et al., 2013; Wainger et al., 2014). Aujourd'hui, ce chiffre est monté à une vingtaine ([cf. Tableaux 10-13, Chapitre 4](#)).

Toutes ces études modélisent la SLA avec des MNs spinaux générés à partir de différents protocoles. Comme le montre *Sances et al.* ([cf. Tableau 9, p.73](#)), il existe presque autant de protocoles que de publications, avec des cinétiques de génération (induction, spécification, maturation) très différentes (Sances et al., 2016). De plus, aucune des publications n'a défini quel sous type de MNs a été étudié alors que cela a son importance puisque certaines catégories de MNs sont plus affectées que d'autres dans la SLA, comme décrit dans les chapitres précédents. D'autre part, comme presque toutes les publications ne se focalisent que sur une seule forme de SLA, il est quasi impossible de comparer les cinétiques d'apparition des phénotypes dans les MNs de différents patients.

A mon arrivée dans le laboratoire, une autre limitation des modèles était que les cultures étudiées n'étaient ni pures ni bien définies. Le pourcentage restait proche de 50% et la plupart des cultures contenaient de la glie. Or, comme décrit précédemment dans le chapitre 2, la suppression de la protéine *SOD1* mutée au niveau de la glie rallonge l'espérance de vie des souris *SOD1*^{G93A}, ce qui montre bien que la glie participe à la dégénérescence des MNs dans ce modèle. En outre, utilisant des astrocytes dérivés de tissus *post-mortem* de patients FALS et SALS, *Haidet-Phillips et al.* ont montré que les astrocytes exerçaient un effet toxique sur les MNs (Haidet-Phillips et al., 2011), tout comme *Meyer et al.*, à partir d'astrocytes dérivés de fibroblastes de patients (Do-Ha et al., 2017; Meyer et al., 2014; Pirooznia et al., 2014). Parmi tous ces travaux, seule une étude qui ne concernait que des MNs mutés au niveau du gène *SOD1*, contenait plus de 70% de MNs et était dépourvu de glie (Chen et al., 2014).

Dans ce contexte, mes objectifs ont été de :

1. Générer des cultures pures de MNs et les caractériser finement par RNAseq, avec une optimisation très stricte des conditions de culture afin de pouvoir ensuite comparer les phénotypes de MNs issus de sujets sains et d'individus atteints de SLA.
2. Valider les modèles. Autrement dit, savoir si les MNs générés récapitulent des phénotypes typiques des MNs observés chez les patients (excitabilité) et dans les tissus *post-mortem* d'individus atteints de la SLA (présence d'agrégats et mortalité cellulaire). Pour cela, les analyses ont été réalisées à différents temps pour définir le moment auquel les MNs porteurs de mutations SLA avaient des phénotypes différents par rapport aux MNs contrôles.
3. Comparer dans un même contexte expérimental des MNs porteurs de différentes mutations SLA, du point de vue phénotypique, fonctionnel et transcriptomique afin d'identifier des mécanismes communs ou divergents impliqués dans l'initiation de la SLA.

CHAPITRE 7 : LES RESULTATS

Ce chapitre présente les résultats obtenus lors de mon travail de thèse. Le travail principal sera d'abord introduit puis détaillé sous forme d'article en anglais. Dans une deuxième et troisième partie seront présentés les résultats obtenus en collaboration avec le laboratoire du Dr Van Den Bosch (VIB Institute, Louvain) et l'équipe du Dr Lafon (Institut Pasteur, Paris).

I. ARTICLE 1 : DEFAUTS INTRINSEQUES DE MOTONEURONES SPINAUX DERIVES DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES ISSUES D'INDIVIDUS ATTEINTS DE DIFFERENTES FORMES DE SLA

1. INTRODUCTION

La SLA est une maladie fatale, sans thérapie efficace qui compte 10% de patients FALS. La majorité des formes génétiques sont causées par 4 mutations : les expansions G4C2 au niveau du premier intron du gène *C9ORF72*, les mutations au niveau du gène *SOD1* et les mutations au niveau des gènes codant pour des protéines de liaisons à l'ADN : *TARDBP* et *FUS*.

Les patients porteurs d'expansions G4C2 sont les plus fréquents. Généralement, ils développent une forme rapide de SLA qui commence au niveau bulbaire et la plupart ont aussi des défauts cognitifs. Pour la majorité des patients mutés au niveau du gène *SOD1*, la première faiblesse musculaire est ressentie au niveau des membres inférieurs et la maladie se développe de façon très agressive. Classiquement, les premiers symptômes des individus mutés au niveau du gène *TARDBP* apparaissent au niveau bulbaire ou au niveau d'un membre. Ces patients ont une espérance de vie plutôt courte. Quant à la SLA des patients mutés au niveau du gène *FUS*, elle se déclare majoritairement avant 40 ans et la maladie est plus rapide que la moyenne des patients SLA. Malgré tout, ces observations sont des généralités. Plus qu'une maladie, la SLA est un syndrome dont les premiers symptômes commencent insidieusement, avec une initiation aussi variable que sa progression, rendant le diagnostic et le pronostic difficiles à établir. En effet, certaines mutations sont caractérisées par leur imprédictibilité et aucun traitement curatif et marqueur de diagnostic établi n'existent à ce jour.

Les études sur les patients et sur les modèles animaux ont permis de soulever plusieurs hypothèses pouvant expliquer la dégénérescence spécifique des MNs. La modélisation de la SLA grâce au modèle murin muté *SOD1* a permis de montrer que l'initiation de la pathologie était intrinsèque aux MNs, mais ceci n'a pas été rapporté pour les autres mutations. Ainsi, la SLA pourrait s'expliquer par des perturbations du cytosquelette et du transport axonal, une dérégulation de l'homéostasie protéique, des défauts du métabolisme des ARNs, une augmentation du stress oxydatif et/ou une sensibilité à l'excitotoxicité. Malgré ces hypothèses, le ou les mécanisme(s) impliqué(s) dans l'initiation de la SLA reste(nt) méconnu(s).

Alors que les modèles animaux ne se limitent qu'à certaines mutations, l'utilisation de MNs dérivés d'iPSC permet d'étudier n'importe quelle forme familiale ou sporadique, que l'étiologie génétique soit connue ou non (Guo et al., 2017a). Depuis qu'il est possible de générer des MNs à partir d'iPSC, plus de 20 publications ont étudié des MNs spinaux issus d'individus atteints de SLA.

Ces modèles ont été validés. En effet, ils reproduisent ce qui avait déjà été décrit dans les tissus *post-mortem* d'individus atteints de SLA, tel que des agrégats protéiques ou la perte cellulaire. Néanmoins, la majorité des études publiées à ce jour ont étudié les agrégats spécifiques de la forme génétique dont ils sont issus : les agrégats de la protéine SOD1, TDP-43 ou FUS dans les MNs dérivés de fibroblastes de patients mutés respectivement au niveau du gène *SOD1*, *TARDBP* ou *FUS*, ainsi que la présence de *foci* d'ARNs et de DPR pour les MNs porteurs d'expansions G4C2.

Peu nombreux sont les travaux qui ont essayé de voir si certains marqueurs pouvaient être aussi présents sans forcément être associés à la forme génétique typique de l'agrégat. Or, par exemple la présence d'agrégats de la protéine TDP-43 peut être retrouvée dans la plupart des tissus *post-mortem* de patients qu'ils soient mutés ou non au niveau du gène *TARDBP*. De la même façon l'accumulation de NFs, bien que non spécifique de la SLA est aussi un des marqueurs les plus impressionnants de la pathologie et n'a pas non plus été étudiée extensivement dans les MNs dérivés d'iPSC alors que plusieurs études *post-mortem* ont soumis l'hypothèse qu'ils apparaîtraient de façon précoce, quelle que soit la mutation (Saber et al., 2015). Aujourd'hui, les NFs sont les biomarqueurs les plus prometteurs de la pathologie (Khalil et al., 2018; Rossi et al., 2018b).

D'autre part, les publications concernant les MNs dérivés de patients atteints de SLA ont aussi permis de découvrir de nouveaux mécanismes et/ou de mettre en avant ceux qui seraient impliqués à un stade précoce de la maladie, tels que la perturbation du cytosquelette ou les défauts d'excitabilité. Malheureusement, parce que la majorité des travaux n'étudie qu'une seule forme de SLA, parce que chaque publication se restreint à son propre protocole et parce que chaque protocole produit une culture de MNs plus ou moins pure et plus ou moins bien définie, il est très difficile de comparer les conclusions entre elles et donc d'établir une chronologie précise entre chaque événement pour identifier le ou les défaut(s) primaire(s), intrinsèques et à l'origine de la dégénérescence spécifique des MNs.

Notre objectif a donc été de rechercher les mécanismes communs ou différents impliqués dans la dégénérescence des MNs de formes distinctes de SLA dans un même protocole expérimental, à trois temps différents de culture : au stade de progéniteurs de MNs, au stade de « jeune » MNs (dès que les MNs apparaissent en culture) et à un stade plus mature. En outre, nous nous sommes posé la question de savoir si l'accumulation anormale de protéines et notamment de NFs pouvait induire une altération spécifique au niveau du segment proximal de l'axone, une région cruciale pour maintenir l'intégrité axonale et pour l'initiation du potentiel d'action.

2. RESUME DES RESULTATS

→*GENERATION DES IPSC ET DIFFERENCIATION EN MNS* (Table 1. p.144, Supplementary Fig. 1-4 p.180)

Lors de la reprogrammation de fibroblastes en iPSC, plusieurs clones apparaissent en culture sous forme de « *clusters*²¹ » de cellules que l'on appelle « clone ». Des clones sont ensuite isolés, amplifiés, caractérisés et sélectionnés en fonction de leur capacité à générer les types cellulaires des trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme). Les clones sélectionnés pour chaque sujet contrôle et chaque patient SLA étudié sont listés dans le **Tableau 1** et leurs caractérisations sont présentées dans les **figures supplémentaires 1 à 4**. Il s'agit de quatre patients : un patient porteur de la mutation SOD1^{N139D}, un porteur de la mutation TARDBP^{G348C} et de deux patients porteurs d'expansions G4C2 au niveau du gène *C9ORF72*.

→*DIFFERENCIATION DES IPSC EN MNS, MATURATION ET SURVIE* (Fig1. p.150)

Après la caractérisation des différents clones comme étant des iPSC, les cellules ont été différenciées en MNs pour savoir si les mutations SLA étaient un frein ou non à la différenciation et maturation des iPSC en MNs (**Fig. 1A-1C**).

Nous avons différencié et comparé les pourcentages de MNs obtenus pour 5 clones issus de 3 individus sains (MNs contrôles), 3 clones porteurs de la mutation TARDBP^{G348C}, 3 clones porteurs de la mutation SOD1^{N139D} (chacun issu d'un même patient) et de 3 clones porteurs d'expansions G4C2 dans le gène *C9ORF72* (issus de deux patients différents). Quelle que soit la mutation, les cellules iPSC ont généré autant de MNs que les contrôles (**Fig. 1G**). De plus, tous les MNs exprimaient les transporteurs vésiculaires à l'acétylcholine (VACHT) (**Fig. 1H**) et avaient la capacité de générer des potentiels d'action, montrant ainsi leur maturation et leur fonctionnalité.

D'autre part, nous n'avons pas observé de mort cellulaire évidente dans les MNs SLA, même après 10 semaines de culture (**Fig. 1I**).

→*PROFILS TRANSCRIPTOMIQUES DES MNS CONTROLES ET DES MNS SLA* (Fig. 2, p.152)

Dans un deuxième temps, notre question a été de définir quelle population de MNs nous avions générée. Pour ce faire, nous avons isolé les ARNs des cellules à trois temps différents et réalisé une analyse transcriptomique des principaux marqueurs neuronaux et des marqueurs de cellules gliales (**Fig. 2A**). Les cellules exprimaient avec le temps des facteurs de transcription spécifiques aux progéniteurs de MNs (*OLIG2*, *PAX6*) puis des marqueurs de MNs (*ISLET1*, *HB9*, *ACHE*, *VACHT*), confirmant que les cellules générées étaient bien des MNs spinaux (**Fig. 2B-G**). De plus, aucun marqueur d'astrocytes ou d'oligodendrocytes n'a été détecté, confirmant que la population de MNs étudiée était dépourvue de cellules gliales (**Fig. 2H-I**). L'expression des gènes *HOXC456*

²¹ Cluster de cellule = groupement de cellules ayant la même origine

et *FOXP1* a confirmé que les MNs générés étaient des MNs typiques du niveau rostral de la moelle épinière innervant les MNs de la LMC, colonne la plus affectée par la SLA (**Fig. 2J-2M**).

→ *PERTURBATION DE L'EXCITABILITE DES MNS SLA (Fig. 3, p.154), ANOMALIES PROTEIQUES (Fig. 4 p.156) ET ALTERATION DE L'INTEGRITE AXONALE (Fig. 5 et 6 p.158)*

Après avoir validé que la différenciation des iPSC aboutissait à la génération de cultures pures de MNs spinaux qui dégénèrent dans la SLA, nous avons étudié s'ils reproduisaient les phénotypes typiques associés à la pathologie ; à savoir l'excitabilité des MNs spinaux des individus atteints et la présence des marqueurs majeurs de la pathologie dont (i) la présence d'agrégats TDP-43, composé des inclusions en écheveaux ; (ii) la présence d'inclusions de Cystatine C, spécifiques des corps de Bunina ; et enfin (iii) la présence d'accumulation de NFs.

Les analyses de *Patch-Clamp* ont suggéré que les MNs SLA étaient plus excitables que les MNs contrôles, ce qui était en accord avec les conclusions tirées des études d'excitabilité mesurées au niveau des MNs spinaux de patients atteints de SLA (**Fig. 3**).

Grâce à des marquages immunocytochimiques, nous avons observé la présence d'inclusions neuritiques de la protéine SOD1 dans les MNs porteurs de la mutation SOD1^{N139D} (**Fig. 4A**) et de *foci* d'ARNs dans les MNs porteurs d'expansions G4C2. Nous avons aussi observé de rares agrégats TDP-43 uniquement dans les MNs porteurs de la mutation TARDBP^{G348C}, et sans délocalisation nucléaire de la protéine (**Fig. 4B et 4C**). Dans ces MNs, était aussi accumulée de la Cystatine C au niveau des somas ainsi qu'au niveau de prolongements neuritiques. De façon moins importante, la Cystatine C était aussi accumulée dans les somas des MNs porteurs des expansions G4C2, mais pas dans les MNs mutants SOD1^{N139D} (**Fig. 4D et 4E**). En outre, nous avons retrouvé des accumulations de NF-L et de pNFs dans les MNs mutants SOD1^{N139D} et *C9ORF72*.

De façon intéressante, nous avons montré que les accumulations de pNFs étaient localisées au niveau de l' AIS et qu'en leur présence l'intégrité de ce segment était altérée. Sachant que l' AIS joue un rôle dans la polarité axonale et l'initiation du potentiel d'action, notre modèle propose que la perturbation de ce segment pourrait altérer l'intégrité des MNs de patients (**Fig. 5 et 6**).

→ *ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE PAR RNA-SEQ (Fig. 7, p.162 et Table 2-5 p.145).*

Afin de voir si les altérations phénotypiques observées après la maturation des MNs étaient liées à des dérégulations moléculaires ou étaient présentes plus tôt, nous avons réalisé une étude transcriptomique en séquençant les ARNs des MNs dérivés d'iPSC. Nous avons comparé les différents MNs SLA par rapport aux MNs contrôles à chaque stade de différenciation. Nous avons aussi comparé comment les gènes étaient régulés entre chacun de ces stades pour les MNs SLA et les MNs contrôles.

Alors qu'il n'y a pas de variation au niveau de l'expression des gènes des MNs contrôles jeunes et des MNs contrôles plus matures, ce n'est pas le cas des MNs SLA, dans lesquels près de 2500 gènes sont exprimés différemment lors de la maturation (**Fig.7A et 7B**). Ainsi, l'analyse

transcriptomiques entre de jeunes MNs SLA et des MNs SLA plus matures a permis de mettre en évidence deux voies de signalisations dérégulées, dans le temps, et par rapport aux contrôles : la voie de signalisation « SLA (hsa05014) » (**Tableau 2**) et la voie de « l'interaction entre Ankyrines et protéines de liaisons L1 (R-HAS-445095) », sachant notamment que l'AnkG est le composant organisateur de l' AIS (**Tableau 3**). De plus, lors de la maturation, une grande partie des gènes dérégulés était associée aux potentiels d'action, à l'organisation du cytosquelette et au transport axonal (**Tableau 4**).

En outre, nous avons observé que deux gènes codant pour des protéines pouvant être sécrétées (CHL1 et CTSF) étaient dérégulés au cours de la différenciation des MNs SLA suggérant qu'elles pourraient potentiellement être de précoces biomarqueurs de la pathologie (**Fig. 7G, H et Tableau 5**).

3. CONCLUSION

Puisque les mutations n'empêchent pas la différenciation des cellules en MNs, nous avons pu mettre en évidence les points communs et les divergences provoqués par trois différentes mutations de SLA (*SOD1^{N139D}*, *TARDBP^{G348C}* et *C9ORF72^{(G4C2)ⁿ}*) dans des MNs spinaux de la LMC dans un même contexte expérimental.

En présence de NTFs, nous n'avons pas mis en évidence de mortalité des MNs, mais nous avons pu observer des différences d'excitabilité avec le temps.

Après deux semaines de maturation, nous avons observé des accumulations/agrégations spécifiques à chaque mutation : des agrégats de protéine SOD1, des *foci* d'ARNs et des agrégats de la protéine TDP-43 respectivement dans les formes mutées au niveau des gènes *SOD1*, *C9ORF72* et *TARDBP*.

De façon cohérente avec la littérature, la protéine Cystatine C était accumulée dans les MNs mutants *C9ORF72* et *TARDBP*, mais pas dans les MNs *SOD1*. D'autre part, nous avons mis en évidence la perturbation de différentes sous-unités de NFs, notamment l'accumulation de pNFs au niveau du cône d'émergence de l'axone et de la partie proximale de l' AIS dans les MNs mutés au niveau des gènes *SOD1* et *C9ORF72*. Ces accumulations étaient associées à une délocalisation distale de l' AIS, une perturbation de la localisation de canaux Na⁺ voltage-dépendants et une augmentation du calibre axonal.

Les analyses transcriptomiques lors de la maturation des MNs SLA ont renforcé ces résultats où différentes voies de signalisations associées aux phénotypes observés étaient significativement dérégulées (« SLA », « interaction Ankyrine/L1 », et dérégulations de protéines impliquées dans la génération des potentiels d'action). En outre, le gène *CHL1* - codant pour une protéine nécessaire au recrutement de l'ANKG à la membrane - était dérégulé dans les MNs SLA, y compris dans les

MNs TARDBP où l'accumulation au niveau de l'AIS n'a pas été mise en évidence (bien qu'ils présentaient malgré tout des accumulations de NF-L). A noter qu'il n'a pas été possible de réaliser des tri-marquages AnkG/NF-L/pNFs du fait de la nature des anticorps disponibles. Cela aurait peut-être pu permettre de montrer si des accumulations spécifiques au niveau de l'AIS des MNs TARDBP^{G348C} avaient les mêmes conséquences.

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la chronologie des évènements pathologiques est différente entre chaque mutation et qu'une dérégulation de l'AIS pourrait être un événement précoce commun impliqué dans l'intégrité des MNs et la pathogénicité de la SLA.

Comparison of motor neuron intrinsic defects in patients with various forms of Amyotrophic Lateral Sclerosis.

C. Lefebvre-Omar (1), E. Liu (1), C. Dalle (1), B. Lamotte d'incamps (2), S. Blanchard (3), G. Tournaire (3), G. Bisch (3), C. Nicaise (4), M. Davenne (1), F. Salachas (1, 5), L. Lacomblez (5), D. Seilhean (1, 6), C. Lobsiger (1), S. Millecamps (1), S. Boillée (1), D. Bohl*(1).

(1) Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, INSERM U 1127, CNRS UMR-7225, Sorbonne Université, Paris, France

(2) Center for Neurophysics, Physiology and Pathologies, CNRS UMR 8119, Université Paris Descartes, Paris, France

(3) Institut Pasteur, INSERM U1115, Unité Biothérapies pour les Maladies Neurodégénératives, Paris, France

(4) URPhyM, NARILIS, Université de Namur, Belgium

(5) Département de Neurologie, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), Centre de ressources et de compétences SLA Ile de France, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

(6) Département de Neuropathologie, AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

*** Corresponding author:**

Delphine Bohl

delphine.bohl@icm-institute.org

Abstract

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a heterogeneous neurodegenerative disorder characterized by a selective and progressive loss of motor neurons (MNs), leading to muscle atrophy, paralysis and death. Despite years of studies in ALS animal models and patients, and the description of various mechanisms involved in the pathogenesis of ALS, the causes of MN axonal degeneration and cell death are still unknown and there is no effective treatment.

In order to assess MN intrinsic defects and to identify affected common and divergent genes/pathways in different ALS forms, we compared in a similar experimental context MNs derived from ALS patients. We generated induced pluripotent stem cells (iPSC) from control subjects and patients carrying mutations in the three main genes responsible for ALS: *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP*. iPSC clones were differentiated into pure cultures of spinal MNs of the lateral motor column, primarily affected in ALS. We then compared MNs at the cellular and molecular levels, at three distinct differentiation stages: in MNs precursors, new-born post-mitotic MNs and MNs maintained 2 more weeks in culture.

First, we observed that ALS MNs survived as control ones and were able to fire action potentials. Interestingly, excitability of both mutant *C9ORF72* and *SOD1* MNs became altered with time in culture, whereas mutant *TARDBP* MNs were not affected. In younger cultures, we observed accumulations/aggregations of different proteins, including neurofilaments (NFs), and Cystatin C, a component of Bunina bodies, never searched before. We observed specific patterns of protein accumulations depending on the ALS form. Interestingly, abnormal accumulations of NFs were observed in proximal motor axons in the region including the axon hillock (AH) and the axonal initial segment (AIS), crucial regions for action potential initiation and specific axon integrity. In the presence of phosphorylated heavy NF (pNFs) subunit accumulations in mutant *C9ORF72* and *SOD1* MNs, the AIS and sodium Nav channels were delocalized and axon calibers increased. Whereas these pNF accumulations were not seen in mutant *TARDBP* MNs, common genes and pathways linked to AH, AIS, ion channels and axonal transport were deregulated with time in MNs derived from the 3 different ALS forms.

Taken together, our results suggest that mechanisms leading to MN death in ALS may be the consequences of multiple protein aggregations and the subsequent structural and molecular alterations of AH and AIS axonal proximal regions, two sub-compartments crucial for polarity and excitability of MNs.

Introduction

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal degenerative disorder that primarily affects the motor system. ALS is characterized by rapidly progressive degeneration of the pyramidal tract controlling movement. It is the most common motor neuron (MN) disease in adults and survival is limited to 2-5 years after disease onset. ALS is heterogeneous at different levels with various clinical phenotypes, different rates of disease progression, and at the genetic level with ~90% of sporadic forms (SALS) and only ~10% of familial forms (FALS). G4C2 expansions in the chromosome 9 open reading frame 72 (*C9ORF2*) and mutations in the superoxide dismutase 1 (*SOD1*), the TAR DNA-binding protein (*TARDBP*) and the fused in sarcoma (*FUS*) genes are the most frequent ALS causes and account for ~60% of FALS and close to ~10% of SALS (Ghasemi and Brown, 2018; Laferriere and Polymenidou, 2015).

Today, there is still no treatment so far able to interrupt the disease process. Only riluzole, a glutamate release blocker, provides a few months benefits for patient survival (Bellingham, 2011; Bensimon et al., 1994). Thus, there is an urgent unmet need for new neuroprotective compounds, but also for biomarkers to allow early diagnosis and to monitor disease progression. Among candidates, neurofilaments (NF), the most abundant protein in MNs, are emerging as potential biomarkers (Gaiani et al., 2017; Rossi et al., 2018a). Recently, it was shown in a multicenter study that cerebrospinal fluid (CSF) and serum NF concentrations discriminate ALS with early symptoms onset from other neurologic diseases (Feneberg et al., 2017).

The development of several animal and cellular models of the disease since ALS description allowed to reveal several disease mechanisms that may be involved in MN degeneration and death. But it is clear today that all these biological pathways (*e.g.* perturbations of protein homeostasis and/or RNA metabolism, cytoskeleton disturbance and axonal transport defects, excitotoxicity) are quite numerous and heterogeneous and that the initial dysfunction(s) specific to MNs remains to be defined (Van Damme et al., 2017).

As ALS disease-causing gene mutations are typically inherited in an autosomal dominant manner with one normal allele encoding the normal protein and one mutated gene encoding a mutated one that can acquire new conformations and/or new functions, the primary event in mutant cells may be a response to the presence of this abnormal protein. Indeed, at the cellular level, the presence of ubiquitin-positive inclusions in the remaining MNs of spinal

ventral horns of patients are among common ALS pathological features, as well as axonal retraction and loss of MN cell bodies. TDP-43 was shown to be present in these ubiquitin-positive inclusions in 95% of patients (Blokhuis et al., 2013). But this is not the only protein that accumulates in ALS MNs. Indeed, nuclear and cytoplasmic accumulations or aggregates/inclusions were shown to contain proteins encoded by either ALS and non-ALS associated genes, such as SOD1, FUS, C9ORF72 DPRs (dipeptide repeats), NFEH (heavy NF), SQSTM1 (p62), PFN1 (Profilin1), PRPH (Peripherin), CST3 (Cystatin C), and TRFE (Transferrin) (Blokhuis et al., 2013; Kato, 2007; Mizuno et al., 2006; Okamoto et al., 1993; Ravits, 2014), suggesting that MN accumulations and/or aggregates may have heterogeneous contents from one patient to another.

In order to assess whether these heterogeneous aggregates/inclusions are present in MNs derived from different ALS forms and may lead to a common defect in MNs, we generated induced pluripotent stem cells (iPSC) from patients carrying mutations in the three main genes responsible for ALS: *C9ORF72*, *SOD1*, and *TARDBP*. We then compared in a similar experimental context MN intrinsic defects at the cellular and molecular levels at different time-points of their differentiation status. Several studies already described iPSC models but the vast majority focuses on one ALS form. Interestingly, these studies showed protein accumulations/ aggregations in MNs, but only those of their genetic background (Bhinge et al., 2017; Bilican et al., 2012; Chen et al., 2014; Dafinca et al., 2016; Egawa et al., 2012; Higelin et al., 2016; Ichiyanagi et al., 2016; Lenzi et al., 2015; Liu et al., 2015; Lopez-Gonzalez et al., 2016; Naumann et al., 2018; Sareen et al., 2013; Selvaraj et al., 2018; Westergard et al., 2016). Another limitation to the comparison of MN phenotypes observed between ALS forms in published reports is that there are nearly as many protocols to generate iPSC-derived MNs as publication numbers (Bohl et al., 2016; Sances et al., 2016). Even in studies comparing different ALS forms, MN cultures were either of unknown purity, contained less than 50% of ISLET1-positive neurons or contained astrocytes that may affect intrinsic MN properties (Burkhardt et al., 2013; Devlin et al., 2015; Fujimori et al., 2018; Imamura et al., 2017; Naujock et al., 2016; Wainger et al., 2014), making comparisons nearly impossible.

Another important question is related to the specific susceptibility of MNs to cell death compared to other mutated cells as ALS causing genes are ubiquitously expressed. One hypothesis is linked to the great length of its axon and requirements necessary to maintain axonal polarity and its specific functions. Also among highly specialized neuronal

compartments, the axon initial segment (AIS) localized in the proximal axonal region, just after the axon hillock (AH), serves crucial neuron-specific physiological functions (Nelson and Jenkins, 2017). AIS is the site of action potential initiation and plays an essential role in axon-dendritic polarity (Jones and Svitkina, 2016; Leterrier, 2018), regulating protein mobility between the soma and the axon with a surface diffusion barrier. AIS molecular components include ion channels and cell adhesion molecules anchored to a specialized ankyrin/spectrin scaffold connected to both actin filaments and microtubules. The central interacting hub of the complex is Ankyrin G. Interestingly, each neuron subtype seems to have a specific AIS responsible to its particular excitability properties, depending on AIS length and distance from the soma, and its combination and distribution of voltage-gated sodium (Nav) and voltage-gated potassium (Kv) channel isoforms. Recently, AIS was shown to be affected in a vast range of pathological conditions and was pointed out as the place of axonal transport perturbations present in neurodegenerative diseases (Huang and Rasband, 2018). In ALS, in the $SOD1^{G93A}$ mouse model, accumulations of both NFs and mitochondria were described in the AIS (Sasaki et al., 2005b, 2005c), consistent with axonal proximal alterations described in ALS *post-mortem* tissues of patients (Sasaki and Iwata, 1996b, 1996c, 2007; Sasaki and Maruyama, 1992b; Sasaki et al., 1989, 1990). In the present report, we asked whether the AH and AIS were altered in ALS iPSC-derived MNs and whether this could be linked to protein accumulations in this proximal axonal region. For that purpose, ALS iPSC-derived MNs were compared using protein immune-labelling, electrophysiology recording and gene expression profiling to compare pathophysiological alterations induced in MNs by the presence of three main ALS mutations ($C9ORF72^{G4C2}^n$, $SOD1^{N139D}$ and $TARDBP^{G348C}$), and to identify commonalities and divergences between ALS forms that could have an impact on early therapeutic strategies.

Materials and methods

Human cells

To establish a fibroblast collection from ALS patients to generate iPSC, skin biopsies were proposed to french ALS patients, in collaboration with the French National Referral Center for ALS at the Pitié-Salpêtrière hospital (Paris, France) and the Institut Pasteur (project promoter) (Paris, France). This protocol was validated by the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) and a Comité de Protection des Personnes (CPP) (CPP Ile de France VI; protocol 2010-33-ALSCELL). Fibroblasts from the TARDBP gene mutated patient were obtained from the Erasmus Hospital (Brussels, Belgium) after informed consent of the patient and approval of an ethical committee (CPP Ile de France II, DC 2011-534). Explicit consents were signed by patients. For control subjects, skin fibroblast cultures were obtained from the Centre de Ressources Biologiques (CRB) of Lyon (France). A statement of all biological samples was made according to french laws formulated by the Research Ministry.

***Post-mortem* tissues of ALS patients**

The patients were enrolled in a brain donation program declared to the Ministry of Research and Universities, as requested by french laws. An explicit consent was signed by the patient himself, or by the next of kin, in the name of the patient, in accordance with the French Bioethical Laws. Three levels of spinal cord (cervical, thoracic, lumbar) were taken. Immunostainings with pNFs were performed after deparaffinisation of 5 µm thick sections by an automatic slide stainer (Benchmark XT Ventana staining system). Slides were pre-treated at 95°C in either CC1 (pH 8) proprietary retrieval buffer (Ventana Medical Systems). Antibodies were targeted with a biotin-free detection system (Ventana Medical Systems ultraview universal DAB Detection Kit).

IPSC generation and characterization

For two control subjects (11 and 33 years-old) and the patient TARDBP mutated patient, reprogramming of fibroblasts into iPSC was done with integrative retroviral vectors as previously described (Lemonnier et al., 2011), except that TARDBP mutant fibroblasts were reprogrammed with 5 vectors encoding OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC and NANOG.

Other fibroblasts (the control subject of 69 years-old and the three patients mutated in *SOD1* and *C9ORF72*) were reprogrammed with integration-free CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (ThermoFisher Scientific), as described previously (Gautier et al., 2016). Briefly, after transduction of fibroblasts with vectors, fibroblasts were plated either onto irradiated mouse embryonic fibroblasts (iMEF) or on Geltrex (ThermoFisher Scientific)-coated plates in feeder-free conditions. iPSC-like clones were observed ~3 weeks after genes transfer. Clones were picked and expanded, and manually passaged every 5-7 days. After few passages, colonies were passaged with 0.5mM UltraPure™ EDTA pH 8.0 (ThermoFisher Scientific), and maintained in Essential 8 Medium (ThermoFisher Scientific) on Geltrex-coated plates. One control iPSC clone (named Ctrl60) was obtained from the European Collection of Authenticated Cell cultures (HipSci supplier) (UK) and is derived from fibroblasts of a 60-64 years-old man (catalogue number: 77650156).

Quality control for iPSC was performed as suggested by the International Stem Cell Banking Initiative (International Stem Cell Banking Initiative, 2009). iPSC were cultured as Embryoid Bodies (EBs) for 10 days and then plated on Geltrex and cultured in fibroblast medium (DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum) for another 10 days to induce spontaneous differentiation. Pluripotency and differentiation potential of iPSCs and their EB derivatives were analyzed by immunostaining and PCR with reverse transcription (RT-PCR), as described previously (Lemonnier et al., 2011; Toli et al., 2015). When integrative vectors were used for reprogramming, quantitative RT-PCR was performed as described previously (Toli et al., 2015) to confirm efficient repression of exogenously introduced genes (**Supplementary Fig. S2**). Genome integrity was assessed by Illumina Human OmniExpress-24 SNP array (300,000 markers) (Integrage, Evry, France) and analyzed using KaryoStudio and GenomeStudio softwares (Illumina). SNP deviations in the iPSC lines were compared to the original pool of fibroblasts. These analysis confirmed the identity of the iPSC clone compared to the original fibroblasts and that they had not acquired large-scale copy number variations, although a small number of small-scale indels were found (well below the level that would be detected by G-banding). Genotyping of *SOD1* and *TARDBP* mutations as well as analysis of hexanucleotide expansions in the *C9ORF72* gene were performed by PCR on genomic DNA isolated from fibroblasts, iPSC clones and derivatives by PCR amplification and sequencing (Millecamps et al., 2012).

Differentiation of iPSC into MNs

MNs differentiation was performed as described by *Maury et al. 2015* (Maury et al., 2015) with slight modifications. Briefly, iPSC clones were dissociated within StemPro™ Accutase™ (ThermoFisher Scientific) and $2 \cdot 10^5$ cells/ml were suspended into a Neuronal Basic Medium (NBM) composed by 1:1 DMEM/F-12 / Neurobasal™ (ThermoFisher Scientific), L-Ascorbic acid (0.01 μ M, Sigma), N2 (ThermoFisher Scientific) and B27™ supplement minus vitamin A (ThermoFisher Scientific), supplemented with SB431542 (20 μ M, Tocris Bioscience, Bristol, UK), LDN-193189 (0.2 μ M, Stemgent) and CHIR99021 (3 μ M, Stemgent). Embryonic Bodies (EBs) were formed within one day and 2 days later the NBM was supplemented with retinoic acid (0.1 μ M, Sigma) and SAG smoothed ligand (0.5 μ M, Enzo Life Sciences, NY, USA) until day 14. CHIR99021 was removed at day 2, while SB431542 and LDN-193189 were removed at day 4. BDNF, GDNF (10ng/mL, Miltenyi Biotec) were added at day 7. At day 9, DAPT (10 μ M, Sigma) was added and EBs were dissociated the next day with Trypsin-EDTA (ThermoFisher Scientific) (pMNs, **Fig. 1A**). Dissociated single cells were seeded onto coverslips coated either with PEI (Polyethyleneimine) solution (2mg/ml, Sigma) or Polyornithine (100 μ g/ml, Sigma) and Laminin (20 μ g/ml, Sigma). Between day 14 and day 17, cells were incubated in NBM with DAPT, BDNF and GDNF. From day 18 (T0, **Fig. 1A**) and until the end of each experiment, DAPT was removed from NBM, while CNTF and IGF1 were added (10ng/mL, Miltenyi Biotec) (**Fig. 1A**).

Immunocytochemistry

Cells were washed in phosphate buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Euromedex) for 10 minutes at room temperature (RT). For ion channels staining, cells were fixed 10 minutes with PFA 1% (RT) and 10 minutes in Methanol at -20°C. Cells were then incubated in a blocking solution (PBS supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA), 2% normal goat serum (NGS), 0.1% Triton-X100) for 1 hour (RT). Primary antibodies were added and cells were incubated either for 2 hours at RT or overnight at 4°C. Secondary antibodies were added for 1 hour at RT in PBS supplemented with BSA and NGS (**Supplementary Table S1 and S2**). Nuclei were stained with Hoechst H33342 (ThermoFisher Scientific). Slides were mounted with Fluoromount G (Southern Biotech). Optical sectioning was obtained using an Imager.M2 equipped with

AxioCAM MRm, Apotom.2 module, HXP 120C light source, Objectives/NA : 20X/0.8; 40X/1.3;63X/1.4. Confocal images were obtained with SP8 X WLL, DMI8 stand (Leica).

Electrophysiology

Whole-cell patch clamp recordings were performed on iPSC-derived MNs, derived from SOD1-2, C9ORF72-1, TARDBP-1 iPSC clones, as well as three control clones. Three days after pMNs dissociation and plating, neurons were incubated (90 minutes at 37°C) with lentiviral vectors carrying the cDNA encoding the Red Fluorescent Protein (RFP) under the control of the HB9 promoter (Marchetto et al., 2008). Lentiviral vectors were prepared as previously described (Toli et al., 2015). RFP expression was observed few days later.

Patch pipette were pulled from thin wall borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus) on a Zeitz DMZ puller and had a resistance of 2-3 M Ω when filled with the intracellular solution, containing 10 mM KCl, 130 mM K-gluconate, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 4 mM ATP-Mg, 0.3 mM GTP, 10 mM Na Phosphocreatine, 1 mM EGTA, and 10 mM HEPES, adjusted to pH 7.2 with KOH. The extracellular solution contained 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose and 10 mM HEPES adjusted to pH 7.3 with NaOH. Whole-cell recordings were performed using an Axopatch 200B (Molecular Devices). Data were low-pass filtered with an eight-pole Bessel filter at 2 kHz and then digitized at a sampling rate of 50 kHz with a Digidata 1440A analog-to-digital interface. Data were acquired with pClamp 10 software (Molecular Devices). Capacitance transients were cancelled out. Series resistance was typically between 5-7 M Ω and was compensated by at least 70% for voltage-clamp experiments. Only cells with an $R_s \leq 10\text{M}\Omega$ and a resting membrane potential (RMP) more hyperpolarized than -20mV were included in data analysis. Access resistance was monitored at the end of the experiment and the cells were discarded if the series resistance change by more than 20%. In current clamp mode, holding potentials were corrected for a calculated liquid junction potential of 15 mV. Resting membrane potential was determined by averaging for 30 s of recording and afterward a holding current was used to clamp the resting membrane potential as close as possible of -70mV. Voltage and current clamp protocols are provided in the results section. Whole cell recordings were performed on control and experimental group neurons in parallel on the same day. Only neurons with visually identified expression of fluorescent reporters were targeted for patching. Electrophysiological recordings were carried out at room temperature (22-24°C). Data were analyzed off-line using Clampfit 10 software

(Molecular Devices) and OriginPro (Origin Lab Corporation). The AP trace immediately above threshold was used to determine the delay of the first spike, AP threshold, AP amplitude, and AP half width. AP frequency was obtained by measuring the maximum number of spikes during the current steps protocol (1 s).

Image Analysis

The maximum intensity projection of Z stacks composed by 3 images was used to measure neurons characteristics with a semi-automatic Fiji Macro. Only cells with a soma-derived AIS were included in the quantitative analysis. First, the AnkG-labelled AIS and pNF-M/H accumulations were automatically detected with an intensity threshold. Then, MNs cell bodies, the GAP (from the soma to the AIS) and the AIS region were drawn by hand on the pNF-M/H- and panNav-labelled images. We called the space between the soma and the AIS : GAP. The GAP rather than the AH was chosen to define the zone between the AIS and the soma as the method used to measure it did not allow to define strictly the AH. ROIs were registered, source images were reopened and the following measures were done automatically: (1) soma, AIS and GAP areas, (2) GAP and AIS lengths, (3) AnkG, pNF-M/H, panNav immunofluorescence integrated density in GAP and AIS regions. The integrated density corresponds to the product of Area and Mean (immunofluorescence) Gray Value. GAP and AIS integrated densities were summed to obtain pNF-M/H and panNav distribution from the soma to the end of the AIS. To compare panNav integrated density within the GAP, cells without GAP region were removed (**Supplementary Fig. S8D**). Mean axonal calibers were obtained by dividing GAP and AIS areas by their respective length (**Supplementary Fig. S8B and S8C**). We assumed that differences between integrated densities were significant after Kruskal-Wallis with Dunn's test if the fold difference was up to 3.

To measure somatic accumulation of Cystatin C or NF-L, the maximum intensity projection of Z stacks composed by 3 images was used. First, MNs cell bodies were circled by hand on β -tubulin-labelled images and ROI registered. Second, intensity threshold was set up on CysC or NF-L random images of control MNs. Then, area fractions per cells were calculated.

RNA extraction and sequencing

Total RNA was extracted using the RNeasy Plus Micro kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. All RNAs were analyzed for quantity and quality. RNA concentrations were determined with High Sensitivity RNA ScreenTape on TapeStation (Agilent). cDNA libraries were prepared using KAPA mRNA Hyper Prep kit (Roche) according to the manufacturer's protocol. Sequencing was performed on a NextSeq 500 (Illumina).

RNA-Seq data analysis

RNA-Seq data analyses were performed by GenoSplice technology (www.genosplice.com). Sequencing, data quality, reads repartition (e.g., for potential ribosomal contamination), and insert size estimation are performed using FastQC, Picard-Tools, Samtools and rseqc. Reads are mapped using STARv2.4.0 (Dobin et al., 2013) on the hg19 Human genome assembly. Gene expression regulation study was performed as already described (Noli et al., 2015). Briefly, for each gene present in the Human FAST DB v2016_1_full annotations, reads aligning on constitutive regions (that are not prone to alternative splicing) were counted. Based on these read counts, normalization and differential gene expression were performed using DESeq2 (Love et al., 2014) on R (v.3.2.5). Only genes expressed in at least one of the two compared experimental conditions were further analyzed. Genes were considered as expressed if their rpk value was greater than 98% the background rpk value based on intergenic regions. Pathways analyses were considered statistically significant for p -values ≤ 0.05 . Significant differential expression was defined as adjusted p -values ≤ 0.05 (P-Adj) after false discovery rate correction and fold-changes ≥ 1.5 .

Analysis for enriched GO terms, KEGG pathways and REACTOME pathways were performed using DAVID Functional annotation Tool (v6.8). GO terms and pathways were considered as enriched if fold enrichment ≥ 2.0 , uncorrected p -value ≤ 0.05 and minimum number of regulated genes in pathway/term ≥ 2.0 . Three analyses were performed: using all regulated genes, using up-regulated genes and using down-regulated genes. Union of these three analyses was made to provide a single list of results.

Quantitative PCR

Reverse transcription of 1µg RNA into cDNA was performed with the SensiFAST cDNA synthesis kit (Bioline, France). Quantitative reverse transcription PCR was then performed in a Roche LightCycler480 using 100 ng of equivalent cDNA and the LightCycler probes master according to Roche procedures. Primers were from ThermoFisher Scientific: Hs00544069_m1, Hs00186901_m1 and Hs02786624-g1 for CHL1, CTSF and GAPDH, respectively.

Statistical analysis

A minimum of three independent experiments, considered as 3 differentiation batches from iPSC, was always performed. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6. D'agostino & Pearson normality test was used to verify Gaussian distribution for large data. For data passing normality test one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test was performed. For data not passing normality test, Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test were used. When normality test was not possible Gaussian distribution was assumed. Differences in integrated density were validated if the threshold was up to 3. Stars or Small Phi represent the significance levels as follow */ $p < 0.05$; **/ $p < 0.01$, ***/ $p < 0.001$, ****/ $p < 0.0001$.

For electrophysiological analysis, we only compared MNs with the same genetic background before T2 and T3. We did not compare control MNs to mutant ones at the different time-points as we only analyzed one iPSC clone per genotype and as the number of patched cells was in the range of 20 to 25 (see also legend of Figure 3).

Results

iPSC generation

iPSC clones were generated from four patients with different ALS mutations (1 patient mutated in *SOD1*, 2 patients mutated in *C9ORF72*, 1 patient mutated in *TARDBP*) and four control volunteers (**Table 1**). The patient harboring the N139D mutation in the *SOD1* gene was reported previously (Millecamps et al., 2010) and developed a slow progressive disease. The patient mutated in *TARDBP* (*TARDBP*^{G348C}) and the two patients harboring hexanucleotide expansions in the *C9ORF72* gene developed rapid and aggressive disease forms, respectively, and were not previously described. Human iPSC clones were generated from control and patient's fibroblasts and two to three clones per subject were fully characterized. iPSC clones included in our analysis are listed in Table 1. In analysis, we systematically compared at least 2 iPSC clones per subject to validate our observations (Ctrl33, Ctrl69-1, Ctrl69-2, SOD1-1, SOD1-2, TARDBP-1, TARDBP-2, ¹C9ORF72-1, ²C9ORF72-2, ²C9ORF72-3) (**Table 1, Supplementary Fig. S1-4**). One control clone (Ctrl11) was previously described (Toli et al., 2015) and another one (Ctrl60) was obtained from a European Collection (See Materials and Methods).

iPSC clones expressed human embryonic stem (ES) cell markers (**Supplementary Fig. S1A**) and endogenous pluripotency-associated genes were re-activated compared to parental fibroblasts (**Supplementary Fig. S1B**). iPSC pluripotency was shown by *in vitro* three-germ layer differentiation assays (**Supplementary Fig. S1C**). Genome integrity was assessed by Illumina Human OmniExpress-24 SNP arrays. SNP deviations analysis in iPSC lines compared to their original pool of fibroblasts confirmed the parental identity of each iPSC clone and that they had not acquired large-scale copy number variations (**Supplementary Fig. S3**). Genotyping of *SOD1* and *TARDBP* mutations as well as hexanucleotide expansions in the *C9ORF72* gene confirmed the presence of mutations and expansions in both parental fibroblasts and iPSC clones (**Supplementary Fig. S4**).

ALS mutations do not prevent differentiation and survival of MNs

To assess whether ALS mutations alter MN differentiation and survival, all control and ALS iPSC clones were differentiated into MNs according to Maury et al. (Maury et al., 2015) with slight modifications as described in Guo et al. (Guo et al., 2017a) (**Fig. 1A-1C**). Within 10 days differentiated cells expressed the OLIG2 transcription factor (**Fig. 1D**), a

specific marker of spinal MN progenitors (pMNs). Seven days later, the vast majority of post-mitotic neurons expressed ISLET1, a spinal MN marker (**Fig. 1E**). These MNs were still immature at this time-point (at birth, T0) and were not expressing the selective marker of cholinergic neurons, the Vesicular Acetylcholine transporter (VACHT). These cells will be named below “young” MNs (yMNs). After 18 days (T1) in the presence of neurotrophic factors (BDNF, CNTF, GDNF and IGF1), iPSC-derived MNs (mMNs) expressed VACHT (**Fig. 1F**). These MNs will be named mature MNs (mMNs). Importantly, acquisition of firing properties was revealed by whole-cell patch-clamp recordings 2-3 weeks (T2) and 6-7 weeks (T3) later (see below), showing that a culture of functional MNs was obtained. Quantifications of ISLET1 or VACHT β 3tubulin-positive neurons at different time-points assessed differentiation kinetics and efficiencies of control and ALS iPSC clones. **Figure 1G** shows percentages of ISLET1-positive neurons for each control and ALS iPSC clone at T0. No significant difference was measured between control and ALS clones. We quantified 79.1 ± 1.6 % yMNs for control clones (Ctrl11, Ctrl33, Ctrl60, Ctrl69-1, Ctrl69-2), 73.5 ± 2.3 % yMNs for SOD1 clones (SOD1-1, SOD1-2), 84.8 ± 1.6 % yMNs for C9ORF72 clones (¹C9ORF72-1, ²C9ORF72-2, ²C9ORF72-3), and 83.2 ± 4.3 % yMNs for TARDBP clones (TARDBP-1, TARDBP-2) (mean \pm SEM). At T2, percentages of β 3tubulin-positive neurons expressing VACHT reached more than 94% and were similar between control and ALS iPS-derived MNs: 97.4 ± 1.1 % mMNs for control clones, 98.3 ± 1.75 % mMNs for SOD1 clones, 94.8 ± 2.5 % mMNs for C9ORF72 clones, 98.8 ± 1.4 % mMNs for TARDBP clones (mean \pm SEM). (**Fig. 1H**). Finally, we looked for MN survival and found similar ISLET1-positive MN ratios between T0 and T1 in control and ALS MN cultures (**Fig. 1I**). Taken together, these data showed that regardless the presence or absence of an ALS mutation in MNs, ALS progenitors and post-mitotic MNs were generated with same kinetics and efficiencies and survived similarly as control ones in cultures.

Transcriptome profiling in ALS and control MNs

To compare in a similar experimental context different ALS forms, next-generation sequencing (RNA-seq) was performed on total RNA from control and ALS MNs at different stages of differentiation: pMNs, yMNs and mMNs (**Fig. 1A**). Samples included in these analysis included at each time point: 2 or 3 samples for each ALS mutation and six controls (derived from 3 different clones). Principal component analysis (PCA) of

expression data showed efficient segregations of these three different cell types (**Fig. 2A**). No ALS-linked segregation was observed.

We first compared MN differentiation markers between control and mutant SOD1, C9ORF72 and TARDBP pMNs, yMNs, and mMNs. No differential expression was measured for these differentiation markers between control and ALS cells at any time point of the differentiation process. First, to analyze the successful differentiation of iPSC into spinal MNs, we compared differential gene expressions of OLIG2 and PAX6, markers of MNs progenitors, and ISLET1 and HB9, MNs markers (**Fig. 2B-2E**). As expected OLIG2 and PAX6 were expressed only in pMNs, whereas ISLET1 and HB9 were expressed in yMNs and mMNs. We also checked for expressions of enzymes involved in the synthesis of different neurotransmitters including acetylcholinesterase (ACHE), tyrosine hydroxylase (TH), glutamate decarboxylase (GAD1), Glutaminase (GLS1), Dopamine β -hydroxylase (DBH) and Tryptophan hydroxylase (TPH). Whereas ACHE expression increased with differentiation of pMNs into mMNs, no significant expression of TH, GAD1, GLS1, DBH and TPH were measured (**Fig. 2F and Supplementary Fig. S5A-S2F**), showing that only cholinergic neurons were generated in our cultures. VACHT was also expressed in yMNs and mMNs (**Fig. 2G**). Moreover, neuronal purity in differentiated cultures was validated with very low expression levels of GFAP and MBP in cultures, showing the absence of astrocytes and oligodendrocytes in cultures, respectively (**Fig. 2H and 2I**). Next, we looked for expression of HOX genes to assess MN identities along the anterior-posterior axis. Results showed that iPSC-derived MNs expressed a HOX code typical of the rostral spinal cord with high expression of HOXC456 and no expression of HOXC8 (**Fig. 2J and 2K**). Finally, we assessed expression of markers of MN columnar subtypes. Whereas median motor column (MMC) neurons express LHX3 and innervate axial muscles, lateral motor column (LMC) neurons express FOXP1 and innervate limb muscles (Allodi and Hedlund, 2014). LHX3 expression was not detected in iPSC-derived MNs, whereas expression of FOXP1 was measured in all control and ALS MNs (**Fig. 2L and 2M**).

Taken together, these results showed that the protocol for MN generation allowed the efficient differentiation of control and ALS iPSC into pure cultures of spinal cholinergic MNs of the lateral motor column. The latter are the MNs primarily affected in non-bulbar onset ALS patients.

Excitability is altered in ALS MNs

To explore electrophysiological intrinsic properties of ALS iPSCs-derived MNs in our pure cultures devoid of glial cells, we performed whole cell patch-clamp recordings at two late culture time-points (**Fig1A**; T2 and T3). Recordings were obtained from the largest neurons visualized after gene transfer with a lentiviral vector encoding RFP under the control of the HB9 promoter. This labelling as well as the high percentages of VACHT-positive neurons detected in differentiated cultures, ensured that the majority of recorded neurons were MNs. Electrophysiological recordings were used to compare MNs derived from SOD1-2, ¹C9ORF71-1, TARDBP-1 iPSC clones, as well as three control clones.

First, recorded MNs were classified according to their ability to generate an action potential (AP) and their pattern of firing in response to injected currents in the current-clamp mode. We observed 4 patterns of firing: (i) unique AP, (ii) adaptive AP, (iii) repetitive AP, or (iv) inability to fire (**Fig. 3A**). As shown on Fig. 3B, at both T2 and T3 time points almost all recorded control and ALS iPSC-derived MNs were functional neurons able to fire at least one AP. Spontaneous AP were rarely observed. We compared proportions of “repetitive + adaptive” (RA) PA firing MNs between T2 and T3, as it was quite difficult to distinguish both firing patterns. Only for C9ORF72 MNs there was significantly higher percentages of MNs with RA firing pattern compared to control MNs (**Fig. 3B**). SOD1 and TARDBP MNs showed same proportions of the different PA firing patterns compared to control ones. Moreover for control, SOD1 and TARDBP MNs, RMP (resting membrane potential) and AP half width were stable with time, whereas in C9ORF72 MNs RMP and AP half width significantly decreased (**Fig. 3C and 3D**). For AP threshold, there was a slight increase between T2 and T3 in control and C9ORF72 MNs, while it remained constant in SOD1 and TARDBP MNs (**Fig. 3E**). Rheobase, maximum frequency, delay of first spike, peak amplitude and AP amplitude remained stable (**Fig. 3F, 3G and Supplementary Fig. S6A-S6C**).

In voltage-clamp mode the inward current recorded has the fast activation and inactivation characteristic of voltage gated sodium (Na) channel when the outward current has the slow activation and no inactivation of the voltage-gated potassium (K) channel. Our recordings showed that the I_{Na}/I_K ratio increased between T2 and T3 in SOD1 and C9ORF72 MNs (**Fig. 3H**) and our results suggested that this was linked to increased sodium currents density in SOD1 and C9ORF72 MNs. We found no significant difference in Na or K currents density in TARDBP MNs (**Fig. 3I and 3J**).

Taken together, this functional assay showed that excitability of MNs carrying SOD1 mutation and especially those with C9ORF72 G4C2 expansions was altered with time in culture.

Early abnormal protein accumulations in ALS iPSC-derived MNs.

Abnormal protein accumulations/inclusions are hallmarks of the ALS pathology and are well described in human ALS *post-mortem* tissues (Blokhuis et al., 2013; Kato, 2007; Ravits et al., 2013; Saberi et al., 2015). To assess whether such abnormalities were present in ALS iPSC-derived MNs and to search for common and divergent protein accumulation patterns between different ALS forms, immunostaining experiments were done in control, SOD1, C9ORF72 and TARDBP MNs at different differentiation stages (**Fig.4 and 5**).

First, we searched specific features described only in patients harboring SOD1 mutations and G4C2 expansions in MNs: SOD1 aggregates and RNA *foci*, respectively. We observed that SOD1 was expressed in the soma of both control and SOD1 MNs but that aggregates were only observed specifically in neurites of mutant SOD1 MNs (**Fig. 4A**). RNA *foci* were detected only in MNs of the two C9ORF72 mutated patients (not shown, personal communication).

Next, we looked for three main protein accumulations often described in FALS and SALS: (i) TDP-43, the main component of skein-like inclusions, (ii) Cystatin C, the main component of Bunina's bodies, and (iii) neurofilament subunits as witnesses of cytoskeleton disorganization.

Nucleus exclusion, nuclear aggregates, and hyperphosphorylated forms of TDP-43 were described previously as core components of inclusions in patients' tissues, except in SOD1 patients (Saberi et al., 2015). In iPSC-derived MNs, we observed that TDP-43 was not excluded from nuclei. Only rare nuclear TDP-43 and cytoplasmic phosphorylated TDP-43 inclusions were seen at T2 only, exclusively in TARDBP iPSC-derived MNs (**Fig. 4B and 4C**). No specific labelling was observed in SOD1 and C9ORF72 iPSC-derived MNs (not shown).

In patients, Bunina's bodies were reported in all ALS forms, although it seemed rarer in SOD1 mutated MNs (Kato, 2007; Ohi et al., 2004; Shibata et al., 1996). In iPSC cultures, intense granular cytoplasmic and abnormal neuritic labellings of Cystatin C were observed in a large proportion of C9ORF72 and TARDBP MNs (**Fig. 4D**). Quantification showed that cytoplasmic Cystatin C accumulation was significantly increased in iPSC-derived MNs

carrying TARDBP mutation and G4C2 expansions compared to basal levels measured in control and SOD1 MNs (**Fig. 4E**).

Another hallmark of ALS pathology observed at T1 in ALS iPSC-derived MNs with phase contrast microscopy was the presence of bead-like structures in neurites of SOD1 and C9ORF72 iPSC-derived MNs (**Fig. 5A**). Staining of NF-L, light chain subunits of NFs, showed both cytoplasmic accumulation and dashed neuritic staining, reminiscent of bead-like structures, in SOD1, C9ORF72 and also in TARDBP MNs at T1 (**Fig. 5B**). Interestingly, a more intense neuritic staining was also observed in ALS MNs at T0 (**Supplementary Fig. S7A**). Quantification of somatic NF-L staining showed significant accumulation in SOD1 and C9ORF72 MNs at T1 (**Fig. 5D**), while quantification was not significant for TARDBP MNs, despite evident accumulation of NF-L in soma and neurites (**Fig. 5B and 5D**). Moreover, staining of pNF-M/H, phosphorylated medium and heavy chain subunits of NFs, showed significant accumulations specifically in soma and in one proximal neuritic region in SOD1 and C9ORF72 MNs at T1 (**Fig. 5C and 5E**), a phenotype not seen at T0 (**Supplementary Fig. S7B**).

To assess whether NF accumulations were also present in ALS patients, *post-mortem* spinal cord tissues were stained for pNF-M/H in ALS patients mutated in SOD1, C9ORF72 and TARDBP. In all three patients, we observed MN cell body loss and irregular neurite calibers of remaining MNs in the ventral horn of the spinal cord, compared to sensitive neurons in the dorsal horn (**Fig. 5F** showing the example of a SOD1^{D83G} patient). With higher magnification, we observed pNF accumulations/inclusions in the soma and neurites, with more or less large and numerous neurite inclusions in all three patients (**Fig. 5G-5I**). Taken together, these analysis showed that ALS iPSC-derived MNs acquired rapidly different patterns of protein accumulations. Both cytoplasmic and neuritic accumulations were observed.

To look whether these protein accumulations had consequences on cellular organelles at T1, we used electron microscopy. No obvious difference was observed between control and ALS MNs with normal mitochondria, lysosomes, endoplasmic reticulum or Golgi saccules (not shown), suggesting that organelles were not altered in these young MNs.

Alterations of the structural integrity of proximal axonal regions in ALS MNs.

To look whether ALS MNs were altered in their axonal proximal regions, which includes AH and AIS two unique axonal regions crucial for integration of synaptic inputs, initiation

of AP as well as protein trafficking, we focused on pNF-M/H accumulations that were localized in this proximal regions of neurites in mutant SOD1 and C9ORF72 MNs (**Fig. 5C**). First, to confirm that accumulations were exclusively in axons and not in dendrites, we performed co-immunostaining with antibodies against pNF-M/H, MAP2 and AnkG (Ankyrin G), to identify pNFs accumulation, dendrites, and AIS, respectively. We observed that in each MN positive for pNF-M/H staining in ALS MN cultures, NF proteins accumulated at both AH and AIS levels, with a partial overlap of pNF-M/H and AnkG staining (**Fig. 6A and 6B**). To assess whether pNFs accumulations had an impact on the integrity of the axonal proximal region (including AH and AIS), we analyzed whether the AIS was delocalized, whether voltage-gated sodium channels (panNav) distribution was altered, and whether axonal calibers were modified with a triple immunostaining (pNF-M/H, AnkG, panNav) (**Fig. 6C**). We first observed that soma areas (**Fig. 6D**) were not different between the different MN populations without pNF accumulations that we analyzed: control, mutant SOD1, C9ORF72 and TARDBP MNs. However, in the presence of pNFs accumulations, we measured significantly smaller areas of SOD1 MN somatas as compared to control MNs. This difference was not observed for C9ORF72 MNs. AIS lengths were not different between the different MN populations with or without pNFs accumulations (**Fig. 6E**). Then, we analyzed the localization of pNFs accumulations and Nav channels distribution along the axon proximal region. To this aim, pNF-M/H and panNav immunofluorescence integrated densities were measured (See Methods for details) between the soma and the beginning of the AIS (named the GAP), as well as along the entire AIS. In mutant SOD1 MNs, pNFs accumulations were mostly localized close to the soma (**Fig. 6F-6H**) - in the GAP region - whereas in mutant C9ORF72 MNs pNFs accumulated in both the GAP and the AIS (**Fig. 6F-6H**). Nav channels were mostly localized at the AIS and seemed equivalent in all ALS and control MNs (**Fig. 6I, 6J and Supplementary Fig. S8A**). However ratios of panNav integrated density in the AIS over panNav integrated density in the GAP were significantly lower in the presence of pNFs accumulation, suggesting a modified distribution of Nav channels in pathological conditions (**Fig. 6K**). Next, to assess whether the AIS localization was modified along the axon, especially when pNFs accumulated, we measured GAP lengths (**Fig. 6L**). Interestingly, results showed very significant increases in GAP lengths in both mutant SOD1 and C9ORF72 MNs with pNFs accumulations compared to ALS MNs without accumulation or to control MNs, showing that mutant SOD1 and C9ORF72 MNs accumulating pNFs had an AIS segment delocalized towards a distal position when

compared to the control MNs. Finally, to assess whether the caliber of the proximal axonal regions could be modified in the presence of pNFs accumulations, we measured mean caliber of both the GAP and the AIS (**Figures 6M, 6N and Supplementary Fig. S8B and S8C**). Results showed that both regions of the axon had increased calibers in the presence of pNFs accumulation in mutant SOD1 and C9ORF72 MNs, suggesting specific alterations of the proximal axonal region.

Taken together, these data suggested that pNFs accumulations in the proximal region of axons altered the integrity of both AH and AIS with an AIS distal shift, a mis-localisation of Nav channels and increased calibers of the entire proximal axonal region in iPSCs-derived SOD1^{N139D} and C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} MNs (**Figures 6O**).

Transcriptomic analysis of ALS MNs

The RNA-seq data performed at different stages of differentiation of SOD1, C9ORF72, TARDBP and control MNs (pMNs, yMNs and mMNs) allowed us to ask whether observed phenotypic alterations in ALS MNs were linked to molecular defects and if the latter were already present before phenotypic observations. Results also allowed us to look for common and divergent genes and pathways altered in the different ALS forms. For that, we performed comparisons between ALS MNs and control MNs at each time point and between each time point of the differentiation process.

First, we compared differentially regulated genes in all ALS (SOD1, C9ORF72 and TARDBP) MNs or in control MNs between time points (**Fig. 7A and 7B**). Number of differentially regulated genes were equivalent in yMNs and pMNs (7861 and 8081 respectively) in both control and ALS MNs (**Fig. 7A and Supplementary Fig. S9B**). Interestingly, number comparisons of differentially regulated genes between mMNs and yMNs (T0 and T1) were different between control and ALS MNs, with no gene significantly regulated in control MNs and 2539 genes differentially regulated in ALS MNs (**Fig. 7B and Supplementary Fig. S9B**). In these ALS MNs, between T0 and T1, 83 and 86 significant pathways (KEGG and Reactome, respectively) and 547 significant GO terms were found differentially regulated, whereas only 12, 19 and 87 KEGG, Reactome pathways and GO terms were regulated in control MNs. Among KEGG pathways, the “ALS pathway” (hsa05014) was found regulated in ALS MNs between T0 and T1. **Table 2** listed the 11 genes (out of 50) with modified expression levels. Among them, NF-L, NF-M and NF-H, as well as four NMDA/AMPA receptors. Moreover, the “Interaction between

ankyrins and L1” Reactome pathway (R-HAS-445095) was regulated with 10 up-regulated genes (out of 31) listed **Table 3**, including ankyrins, β -spectrin, sodium and potassium channels. Among the 547 GO terms, gene ontology analysis revealed that genes involved in cytoskeleton organization, action potential, ion channels, synapses, and apoptotic processes were significantly differentially regulated in ALS MNs (**Table 4**). Taken together, all these results showed that differentially regulated genes and pathways between T0 and T1, only in ALS MNs, are in agreement with phenotypic abnormalities described above at the level of NFs, AIS ion channels and structural/functional components of the AIS, drawing the hypothesis that abnormal accumulations/aggregations of proteins in the soma and the proximal axons may lead to structural AIS disorganization with consequences on synaptic inputs integrations, initiation of AP as well as protein trafficking in axons.

Next, we looked for common regulated genes between the different ALS forms. In SOD1, C9ORF72 and TARDBP MNs compared to control MNs, we found 64, 0 and 49 regulated genes in pMNs, 60, 16 and 76 in yMNs, and 168, 4 and 429 in mMNs, respectively (**Fig. 7C-7E and Supplementary Fig. S9B**). As TDP43 was shown to bind thousands of RNAs in neurons (Sephton et al., 2011), it was not surprising that the higher number of regulated genes were in TARDBP mMNs. Comparing all ALS MNs to control MNs, we found 9, 96 and 36 differentially regulated genes in common in ALS pMNs, yMNs and mMNs, respectively (**Fig. 7F and Supplementary Fig. S9B**). Among the 9 in common differentially regulated genes in pMNs we identified 2 genes with fold-changes higher than 50: the Close Homolog of Adhesion Molecule L1 (CHL1) and cathepsin F (CTSF) up-regulated by 72 and 6575 fold, respectively. CHL1, which is part of the regulated “Interaction between ankyrins and L1” Reactome pathway (**Table 3**), is a cell adhesion molecule which recruits AnkG to the plasma membrane (Buhusi et al., 2003). It was shown to play a dual role by either promoting or inhibiting neuritogenesis (Tian et al., 2012). More recently, it was shown to guide regrowth of regenerating MN axons and to be involved in regulating cholinergic synapse formation (Guseva et al., 2018). Cathepsin F is a lysosomal cysteine protease implicated in intracellular degradation and turnover of proteins (Nägler et al., 1999; Shi et al., 2000; Stoka et al., 2016; Turk et al., 2012). These two genes were also found up-regulated in yMNs and mMNs (**Table 5**). Whereas both genes were not expressed in control MNs at any time points, early expression in MN precursors was measured by quantitative RT-PCR and we showed abnormal expressions of both CHL1 and CTSF in SOD1, C9ORF72 and TARDBP precursors (**Fig. 7G and 7H**), suggesting that these two proteins may be early markers of the ALS pathology.

Discussion

In the present study we compared in a same experimental context and at different time points, cellular and molecular intrinsic defects in pure cultures of ALS and control spinal LMC iPSC-derived MNs. First, we showed that ALS mutations (C9ORF72^{(G4C2)ⁿ}, SOD1^{N139D} and TARDBP^{G348C}) do not prevent differentiation of MNs within 17 days and we did not observe obvious cell death during all the time of the MN cultures in the presence of NTFs (10 weeks). At this late time point and one month earlier, whole-cell patch clamp recordings showed that all ALS MNs were functional and able to fire PAs. However, results also showed that excitability of both C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} and SOD1^{N139D} MNs was altered with time in culture. Earlier phenotypic defects were observed 2 weeks after MN birth. Besides SOD1, TDP43 protein and RNA foci accumulations found respectively in SOD1^{N139D}, TARDBP^{G348C} and C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} MNs, intense Cystatin C and/or NFs accumulations/aggregations were observed both in soma and neurites in the three ALS forms. The specific accumulations of pNFs in AH and AIS proximal regions in C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} and SOD1^{N139D} MNs were associated with AH and AIS axonal alterations with an AIS distal shift, a mis-localization of Nav channels and increased calibers of proximal axon regions. RNA-seq analysis strengthened these results showing, between ALS yMNs and mMNs, a significant deregulation of genes encoding, among others, the different NF subunits, proteins of the Reactome pathway “interactions between ankyrins and L1” including ankyrins, spectrins and voltage-gated channels, as well as proteins involved in axonal transport, synapses, glutamate response and cell death. Finally, RNA-seq analysis highlighted a highly up-regulated gene in SOD1^{N139D}, TARDBP^{G348C} and C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} MN precursors: CHL1 which encodes a protein involved in the recruitment of AnkG to the plasma membrane but also plays a role in neuritogenesis (Buhusi et al., 2003). Whereas we did not see specific pNF accumulations in proximal axon regions of TARDBP^{G348C} MNs, this CHL1 gene deregulation as well as molecular defects described to be common to all 3 ALS forms, suggested that same alterations might occur in the different ALS forms. Taken together, these results suggest that the initial progressive accumulations and/or aggregations of proteins in soma and neurites of ALS MNs and in particular NF accumulations (also described in patient’s tissues) may lead to alterations in the axonal proximal region including AH and AIS, disruption of interactions between CHL1 and AnkG, with consequences of ALS MN excitability and axonal protein trafficking. Finally, the early upregulation of CTSF encoding a lysosomal enzyme

implicated in intracellular protein degradation and turnover and that can be secreted, may be of interest as an early marker of the pathology.

iPSC-derived MNs are cholinergic MNs of the LMC.

Transcriptomic analysis was performed on ALS and control iPSC-derived MNs, at different stage of differentiation, allowing us to deeply characterize MNs generated in our cultures. We showed that MNs generated according to Maury et al. (Maury et al., 2015) were (i) all cholinergic, (ii) fully pure, without astrocytes, oligodendrocytes and proliferating precursors, (iii) had a rostral identity, and (iv) expressed exclusively FOXP1, the marker of LMC MNs primarily affected in non-bulbar onset ALS patients (Allodi and Hedlund, 2014).

There is no previous report looking so precisely to the molecular characteristics of MN subtypes present in iPSC-differentiated cultures from ALS patients. Indeed, besides the diversity of protocols to generate MNs (Sances et al., 2016), descriptions of cultures were limited to quantifications of β 3-tubulin or Tau positive neurons, of ISLET1 or HB9-positive MNs and of glia cells (Bhinge et al., 2017; Bilican et al., 2012; Chen et al., 2014; Dafinca et al., 2016; Devlin et al., 2015; Egawa et al., 2012; Fujimori et al., 2018; Imamura et al., 2017; Kiskinis et al., 2014; Lopez-Gonzalez et al., 2016; Naujock et al., 2016; Sareen et al., 2013; Selvaraj et al., 2018; Wainger et al., 2014). However, clinical observations of human patients and mouse models suggest that motor pools and MNs are not equally affected (Kanning et al., 2010; Nijssen et al., 2017). The disease usually starts in motor pools controlling the limbs or in the bulbar area before expanding to other pools, with the exception of few resistant ones. Also, within a vulnerable pool, MN subtypes exhibit differential vulnerability with FF and FR MNs (fast-contracting fatigable motor units and fast-tractile fatigue-resistant motor units, respectively) affected first, and S MNs (slow innervating motor units) appearing resistant to degeneration. Thus, in experiments with iPSC-derived MNs, it appears of particular importance to identify which MNs are generated. FOXP1 and LHX3 are transcription factors expressed in different MN subtypes during development and those markers are considered today as good markers of LMC and MMC MNs (Amoroso et al., 2013; Gouti et al., 2014; Maury et al., 2015; Patani, 2016). However, to our knowledge, it is not known whether FOXP1 and LHX3 are also expressed selectively in FF, FR or S MNs. One protein, the C-type lectin chondrolectin (CHODL) was proposed as a marker of Fast-type MNs (Enjin et al., 2010; Martínez-Silva et al., 2018).

CHODL expression was shown to disappear over the course of ALS progression in *SOD1^{G93A}* mice, suggesting that it is somehow linked to MN vulnerability (Wootz et al., 2010). Recently, *Martinez-Silva et al.* showed in ALS mouse models that CHODL was mainly expressed by FF MNs and the largest FR MNs, those that were selectively vulnerable in ALS (Martínez-Silva et al., 2018). We checked for the expression of CHODL in control and ALS MNs and found its expression in yMNs and mMNs without any obvious differences between the two time-points, suggesting that this MN subtype was present in our cultures at the different time-points of intrinsic MN defects analysis.

Survival and excitability of ALS MNs

In agreement with the vast majority of publications on the modeling of ALS with iPSC-derived MNs, we observed that ALS MNs differentiated and survived as control ones (Bhinge et al., 2017; Fujimori et al., 2018; Imamura et al., 2017; Kiskinis et al., 2014). Few studies reported an increased MN cell death in ALS MNs but their cultures contained glial cells that might have an impact on MN survival (Fujimori et al., 2018; Imamura et al., 2017; Kiskinis et al., 2014; Pehar et al., 2017). In *Bhinge et al.* (Bhinge et al., 2017) using the same differentiation protocol of *Maury et al.* (Maury et al., 2015) cell death of *SOD1^{E110G}* MNs was detected after ~20 days of culture. However they used different culture conditions than ours, with low MN densities and low NTF concentrations, favoring stress of MN in cultures. Furthermore, patients carrying the *SOD1^{E110G}* mutation were shown to have a faster disease progression than those carrying the N139D mutation (this study) (Juneja et al., 1997), and recently *Fujimori et al.* (Fujimori et al., 2018) suggested a certain association between ALS pathological progress in clinical and iPSC-based models, that could explain differences observed between our studies.

In our culture conditions, we showed that MNs were functional with almost all recorded ALS and control MNs able to fire at least one PA after a few weeks in culture. However, we observed that with time in cultures *C9ORF72^{(G4C2)ⁿ}* and *SOD1^{N139D}* MNs became more excitable. In agreement with these functional analysis, our transcriptomic analysis showed deregulations of Gene Ontology terms related to membrane depolarization, action potential and expression of genes encoding voltage-gated channels (Tables 3 and 4). Interestingly we also measured up-regulation of NMDA and AMPA receptors (Table 2), involved in excitability of MNs at the dendritic level. These functional and molecular modifications in ALS MNs are in agreement with several studies on functional properties of MNs in ALS

patients (Kanai et al., 2006; Park et al., 2017; Vucic and Kiernan, 2006), in animal models (Bories et al., 2007; Martínez-Silva et al., 2018; Quinlan et al., 2011), and in MNs derived from iPSC/ALS models (Devlin et al., 2015; Guo et al., 2017a; Naujock et al., 2016; Wainger et al., 2014), showing perturbations in the intrinsic biophysical properties of MNs, despite some conflicting results regarding the timing of hyperexcitability versus hypoexcitability of ALS MNs and their detrimental versus beneficial effects on disease progression. Importantly, studies in ALS patients suggested imbalances between axonal potassium and sodium currents (Bostock et al., 1995; Iwai et al., 2016; Kanai et al., 2006; Park et al., 2017). Recently *Howells et al.* (Howells et al., 2018) compared nerve excitability properties of motor axons from ALS patients with those of control subjects. Their mathematical model suggested that changes in axonal excitability in ALS motor axons could be explained by a non-selective reduction in the expression of all ion channels and thus by a failure in the supply of ion channels and other membrane proteins from the diseased MN. Also, interestingly, *Maglemose et al.* (Maglemose et al., 2017) showed a disruption in the distribution of potassium channels before axon swelling in motor axons of pre-symptomatic SOD1^{G127X} mice and suggested that potassium changes were more a consequence than a cause of the neurodegenerative process. Taken together, these results are in agreement with a model in which early alterations occur at the level of the axon proximal organization and composition, preceding functional axonal degenerative changes.

ALS-MNs have different patterns of protein accumulation.

Protein accumulations, inclusions and/or aggregations are markers of ALS pathology and are described in *post-mortem* tissues of SALS and FALS patients (Blokhuis et al., 2013; Kato, 2007; Ravits et al., 2013; Saberi et al., 2015). In our experiments, we observed different patterns of protein accumulations in ALS iPSC-derived MNs at early stage of their differentiation process (2 weeks after their birth). In SOD1^{N139D} MNs, we observed major somatic/neuritic NFs accumulations, without TDP-43 and Cystatin C labelling. In MNs of both patients with C9ORF72 expansions, NFs and Cystatin C accumulations were prominent, with no TDP-43 accumulations. In TARDBP MNs, rare TDP-43, substantial NFs and significant Cystatin C accumulations were observed.

Although not pathognomonic, TDP-43 is described as one of the most significant ALS markers because almost all patients with SALS and FALS, except SOD1 mutated patients, were shown to have a TDP-43 pathology (Ravits et al., 2013). In our ALS MN cultures,

this phenotype was not predominant. This is in agreement with analysis of TARDBP mutant mice that developed MN disease without TDP-43 aggregation or nuclear loss (Arnold et al., 2013), and with reports showing that TDP43 formed aggregates in only few iPSC-derived MNs derived from SALS patients or patients with TARDBP mutations (Bilican et al., 2012; Burkhardt et al., 2013; Egawa et al., 2012; Fujimori et al., 2018; Imamura et al., 2017).

In iPSC-derived MNs, Cystatin C, the major component of Bunina bodies, has never been searched. These inclusions were described in *post-mortem* tissues of the majority of ALS patients, but rarely in patients carrying a SOD1 mutation (Kato, 2007; Ohi et al., 2004; Shibata et al., 1996). These observations are in agreement with our results in ALS iPSC models.

Cystatin C is an inhibitor of lysosomal proteases (cathepsins) thought to regulate proteolysis of the endo-lysosomal pathway (Mathews and Levy, 2016). The specific accumulation in TARDBP and C9ORF72 iPSC-derived MNs suggested an early deregulation of protein homeostasis involving the lysosomal pathway. Of note, cystatin C was already studied as a potential diagnosis biomarker in patients (Mori et al., 2009; Wilson et al., 2010) but a recent review concluded that there was no significant correlation between cystatin C levels in CSF and age or disease duration (Zhu et al., 2018). Interestingly, CTSF encoding the cathepsin F enzyme, which is inhibited by cystatin proteins, is one of the most upregulated gene in iPSC-derived MNs of SOD1 and TARDBP patients at early time points in culture. The exact interactions between cystatin C and cathepsin F are not known, but CTSF, predicted to be secreted (Stoka et al., 2016; Turk et al., 2012), could be of interest as an early marker of the ALS pathology.

NFs accumulations are reported in *post-mortem* tissues of all ALS forms (Xu et al., 1993a) and an accumulation of highly phosphorylated NFs in the initial segment of MN axons was described as a hallmark of ALS (Ackerley et al., 2004; Xiao et al., 2006b; Xu et al., 1993a). We searched for pNF accumulations in *post-mortem* tissues of patients with mutations in SOD1, C9ORF72 and TARDBP and confirmed their motoneuronal presence with more or less large and numerous inclusions, and with some positive staining observed in the initial segment, as reported. In the present report, we described NF-L and pNF-M/H accumulations in SOD1^{N139D} MNs and these results are in agreement with Chen et al. (Chen et al., 2014) showing same phenotypes in SOD1 MNs with other *SOD1* mutations (A4V and D90A). Furthermore, our results showed for the first time accumulations of NF-L and pNF-M/H in MNs of two patients with G4C2 expansions in the *C9ORF72* gene, and even

if the somatic quantification was not significant, NF-L accumulations in both soma and neurites of TARDBP^{G348C} MNs were present. At the molecular level, expressions of the different NF subunits were modified in SOD1^{A4V} or ^{D90A} (Chen et al., 2014) and in TARDBP^{M337V} or ^{Q343R} or ^{G298S} (Egawa et al., 2012) MNs, and these results are also in agreement with our RNA-seq results showing either up (NEFH) or down (NFEL, NFEM) regulations of the NF units in ALS MNs. The main hypothesis today is that this is the alteration in NF subunit proportions that leads to NF aggregations rather than alterations of the NFs themselves (Chen et al., 2014; Côté et al., 1993; Couillard-Després et al., 1998; Kong and Xu, 2000; Xu et al., 1993b). Thereby, concentrations of NF-L and pNF-H subunits in the CSF of ALS patients are today considered as two of the best candidate ALS biomarkers (Gaiani et al., 2017; Rossi et al., 2018a).

The different accumulations in ALS MNs may be toxic, protective or just a non-pathological epiphenomena (unlikely). For example, controversial data have been observed about TDP-43 in both *in vitro* (Budini et al., 2012; Zhang et al., 2009b) and *in vivo* (Gregory et al., 2012; Johnson et al., 2008) models. For NFs, their accumulations/aggregations was shown to precede bead-like swelling in neurites and these swellings are seen as witnesses of cytoskeleton disorganization and axonal transport defects leading to degeneration (Chen et al., 2014).

Early defects and alteration of the AIS

First evidences of cellular abnormalities at the AH+AIS level in MNs, far before AIS molecular description, were done by *Sasaki et al.* (Sasaki and Maruyama, 1992b; Sasaki et al., 1989, 1990). First, they reported on *post-mortem* tissues of three ALS patients that the proximal axonal region was larger in ALS MNs compared to controls, with NFs accumulation. Latter, by electronic microscopy on 11 ALS patients they observed a marked increase or accumulation of mitochondria and lysosomes, presynaptic vesicles and NFs in proximal axons (Sasaki and Iwata, 1996b, 1996c, 2007). They hypothesized that their findings were in agreement with an early impairment of fast axonal transport. Similar observations were done at the pre-symptomatic stage in the SOD1^{G93A} mouse model, with increased NFs and mitochondria at the AH+AIS axonal levels of MNs (Sasaki et al., 2005b, 2005c). At the molecular level, two transcriptomic studies revealed that the *ANK3* gene encoding Ankyrin G was deregulated in *post-mortem* spinal cord tissues of 5 patients with SALS and 2 patients with FALS including one SOD1^{A4V} patient (Dangond et al., 2004),

and more interestingly in human motor nerve diagnostic biopsies of 8 SALS patients, at a time representing an early phase of the disease (Riva et al., 2016).

In the present report, we propose a new model to explain early MN axonal degeneration in ALS pathology. Subsequent to different patterns of protein accumulations in ALS MNs with specific NFs accumulations, molecular and structural alterations of AH and AIS of MNs may be a common early feature to all ALS forms, leading to a loss of AIS and axonal integrity with functional alterations including excitability modifications and specific defects in axonal protein trafficking to synapses and NMJs.

Recently, plasticity and alteration of the AIS components have been implicated in neurodegenerative, psychiatric, and brain trauma diseases (Buffington and Rasband, 2011; Huang and Rasband, 2018; Letierrier, 2016, 2018). But many questions remain regarding factors and pathways involved in AIS functions. Their identification could lead to the development of new therapeutic strategies (Hsu et al., 2014) that could be of interest for ALS patients.

In conclusion, ALS disease is a fatal rapidly progressive neurodegenerative disease with still no cure nowadays. Although many hypothesis exist regarding the mechanisms leading to MN death, the heterogeneity present in this disease sets limitations regarding models that can be used. In this present study, the establishment of a robust replicable protocol to generate pure culture of human MNs has open up possibilities to study and compare different ALS forms and unravel similarities and discrepancies inherited by the mutation.

TABLES

Table 1. Description of ALS patients and control subjects.

ALS gene / mutation	Clones	Sexe	Age at biopsy	Site of onset	Progression
SOD1^{N139D}	SOD1-1 SOD1-2	woman	50	Lower limbs	Slow (>25 years)
¹C9ORF72^{(G4C2)_n}	¹ C9ORF72-1	man	70	Lower limbs	Aggressive (3 years)
²C9ORF72^{(G4C2)_n}	² C9ORF72-2 ² C9ORF72-3	man	51	Bulbar	Aggressive (3 years)
TARDBP^{G348C}	TARDBP-1 TARDBP-2	man	53	Lower limbs	Rapid (6 years)
Control Ctrl11	Ctrl11	man	11	-	-
Control Ctrl33	Ctrl33	man	33	-	-
Control Ctrl60	Ctrl60	man	60	-	-
Control Ctrl69	Ctrl69-1 Ctrl69-2	woman	69	-	-

Table 2. Genes of the KEGG “ALS pathway” (hsa05014, P-value=3.63E-02) deregulated in ALS MNs over control MNs between T0 and T1

	Gene (protein)	Regulation	Fold-change	Ajusted P-value
NFs	NEFM (NF-M)	down	4.55	5.27E-05
	NEFL (NF-L)	down	1.80	4.81E-02
	NEFH (NF-H)	up	3.89	1.01E-04
	PRPH (Peripherin)	up	5.38	1.41E-03
Glutamatergic Réceptors	GRIN1 (NMDAR1)	up	2.94	3.11E-03
	GRIN2B (NMDA 2B=NR2B)	up	11.09	3.08E-06
	GRIN2D (NMDAR2D)	up	6.51	2.10E-07
	GRIA2 (AMPA 2)	up	2.89	2.16E-02
Cell death	BAX (BAX)	down	1.50	1.88E-02
	TNFRSF1A (TNFAR)	up	2.28	1.74E-04
Transcription	HDAC10 (Histone Deacetylase 10)	down	1.68	2.77E-03

Table 3. Genes of the Reactome pathway “Interaction between L1 and Ankyrins”(R-HSA-445095 P-value=6.70E-04) deregulated in ALS MNs over control MNs between T0 and T1.

	Gene (protein)	Regulation	Fold-change	Ajusted P-value
Ankyrins	ANK1 (Ankyrin-R)	up	2.50	1.06E-02
	ANK2 (Ankyrin-B)	up	2.64	5.16E-03
Spectrins	SPTBN1 (β2-spectrin)	up	1.66	2.00E-02
	SPTBN4 (β4-spectrin)	up	6.22	2.38E-07
Voltage-gated channels	SCN1B (Na ⁺ channel subunit β1)	up	3.91	4.15E-05
	SCN2B (Na ⁺ channel subunit β2)	up	3.22	1.44E-05
	SCN3B Na ⁺ channel subunit β3	up	2.16	1.69E-03
	SCN2A (Nav ⁺ channel subunit α Nav1.2)	up	3.46	6.24E-05
	SCN8A (Nav ⁺ channel subunit α Nav1.6)	up	2.22	1.42E-03
	KCNQ3 (Kv ⁺ channel subunit Kv7.3)	up	4.81	2.43E-04

Table 4. Gene Ontology terms significantly regulated between ALS and control MNs between T0 and T1

	Gene Ontology (GO) Terms	% of dysregulated genes of the GO term	Number of dysregulated gene included in the GO term (Up/Down)	P-value
Cytoskeleton and transport	neurofilament bundle assembly	100.0	3 (1/2)	4.14E-02
	actin cytoskeleton reorganization	27.7	13 (12/1)	9.56E-03
	establishment of protein localization	25.0	10 (8/2)	4.95E-02
	actin cytoskeleton organization	21.5	28 (20/8)	3.97E-03
	cytoskeleton organization	21.1	34 (25/9)	1.96E-03
	microtubule cytoskeleton organization	21.1	15 (11/4)	4.76E-02
	cytoskeleton	19.7	73 (59/14)	2.48E-05
	neuronal cell body	18.1	57 (42/15)	1.70E-03
	transport	16.7	58 (41/17)	1.33E-02
Action potential and ion channels	potassium channel complex	66.7	4 (4/0)	2.62E-02
	voltage-gated sodium channel complex	50.0	7 (7/0)	3.82E-03
	voltage-gated sodium channel activity	45.0	9 (9/0)	1.43E-03
	voltage-gated calcium channel complex	34.5	10 (9/1)	5.46E-03
	potassium ion import	32.1	9 (6/3)	1.63E-02
	voltage-gated potassium channel complex	30.7	27 (22/5)	8.56E-06
	voltage-gated potassium channel activity	29.3	17 (14/3)	1.03E-03
	potassium ion transport	26.8	22 (16/6)	7.03E-04
	membrane depolarization during action potential	28.6	8 (7/1)	4.79E-02
	neuronal action potential	28.6	8 (6/2)	4.79E-02
	potassium ion transmembrane transport	25.6	31 (26/5)	1.08E-04
	sodium ion transmembrane transport	21.9	16 (13/3)	2.97E-02
	sodium ion transport	21.0	17 (16/1)	3.54E-02
Synapses	postsynaptic membrane assembly	66.7	4 (4/0)	2.76E-02
	presynaptic active zone	41.4	12 (10/2)	3.23E-04
	potassium channel activity	37.8	14 (13/1)	2.32E-04
	positive regulation of excitatory postsynaptic potential	35.0	7 (5/2)	2.85E-02
	presynapse	26.6	17 (16/1)	3.12E-03
	presynaptic membrane	25.8	16 (14/2)	5.75E-03
Glutamate response	NMDA selective glutamate receptor complex	45.5	5 (4/1)	3.43E-02
	ionotropic glutamate receptor signaling pathway	37.5	9 (6/3)	6.04E-03
Cell death	negative regulation of apoptotic signaling pathway	43.8	7 (5/2)	9.05E-03
	regulation of neuron death	35.3	6 (4/2)	4.82E-02
	negative regulation of neuron apoptotic process	25.0	33 (22/11)	1.02E-04
	positive regulation of apoptotic process	20.0	60 (39/21)	1.47E-04
	negative regulation of apoptotic process	16.3	74 (54/20)	9.32E-03
	apoptotic process	15.0	85 (60/25)	3.62E-02

Table 5. Upregulation of CHL1 and CTSF gene expression in SOD1^{N139D}, C9ORF72(G4C2)_n and TARDBP^{G348C} MNs compared to control MNs at each time point (xFold change/Adjusted P-Value)

Gene		ALS	SOD1 ^{N139D}	C9ORF72(G4C2) _n	TARDBP ^{G348C}
<i>CHL1</i>	pMNs	x72.08 (1.55E-03)	x113.03 (1.60E-02)	-	x64.47 (2.71E-01)
	yMNs	x521.98 (5.79E-09)	x556.76 (1.17E-04)	x386.32 (1.26E-03)	x674.41 (1.16E-03)
	mMNs	x682.00 (8.26E-10)	x792.12 (2.65E-05)	x599.46 (5.48E-04)	x640.11 (5.36E-04)
<i>CTSF</i>	pMNs	x6575.03 (7.75E-04)	x9176.16 (1.65E-10)	-	x9245.06 (2.59E-10)
	yMNs	x9174.17 (2.77E-04)	x14066.05 (8.44E-10)	-	x15596.54 (7.43E-10)
	mMNs	x459.04 (3.91E-03)	x627.57 (1.16E-23)	-	x788.26 (3.19E-23)

FIGURES

Figure 1. ALS mutations do not prevent MN differentiation and survival in cultures.

(A) Schematic representation of the differentiation protocol. CHIR (CHIR99021), SB (SB431542), LDN (LDN193189), RA (Retinoic Acid), SAG (Smoothed agonist), NTF (Neurotrophic factors), DAPT (γ secretase inhibitor), pMNs (MN progenitors), yMNs (young MNs), mMNs (mature MNs). (B, C) Phase contrast microscopy images of yMNs (B) and mMNs (C), showing neuron networks. (D, E) Representative images of β 3-tubulin-positive (TUJ1) cells co-expressing OLIG2 (D) or ISLET1 (E) at day -7 and T0, respectively. (F) At T2, nearly all MNs express the Vesicular Acetylcholine Transporter (VACHT) marker. Scale bars: 20 μ m. (G, H) Quantifications of ISLET1-positive (G) and VACHT-positive (H) neurons at T0 and T2, respectively (mean \pm SEM). n = number of independent experiments. (G) Controls (Ctrl11, Ctrl33, Ctrl60, Ctrl69-1, Ctrl69-2): n = 29; SOD1 (SOD1-1, SOD1-2, SOD1-3): n = 17; C9ORF72 (¹C9ORF72-1, ²C9ORF72-2, ²C9ORF72-3): n = 18; TARDBP (TARDBP-1, TARDBP-2, TARDBP-3): n = 14. (H): Controls (Ctrl33, Ctrl69-1, Ctrl69-2): n = 8; SOD1 (SOD1-1, SOD1-2): n = 4; C9ORF72 (¹C9ORF72-1, ²C9ORF72-2): n = 6; TARDBP (TARDBP-1, TARDBP-3): n=5. (I) Ratio of percentages of ISLET1-positive neurons between T0 and T1 (mean \pm SEM). n = number of independent experiments. Controls (Ctrl33, Ctrl69-1, Ctrl69-2): n = 7; SOD1 (SOD1-1, SOD1-2): n = 4; C9ORF72 (¹C9ORF72-1, ²C9ORF72-2): n = 4; TARDBP (TARDBP-1): n=3. No statistical significance by Kruskal-Wallis with Dunn's test (G) and one-way ANOVA with Tukey's test (H,I).

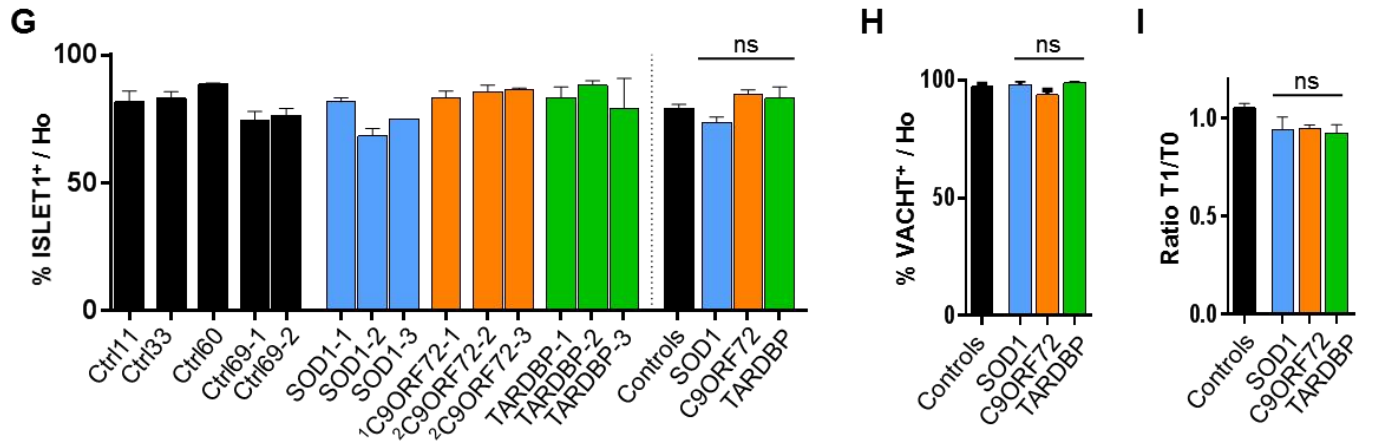
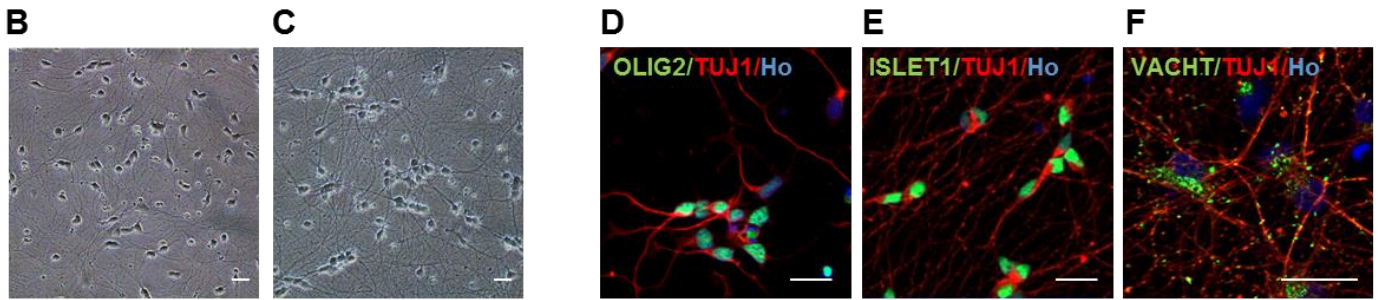
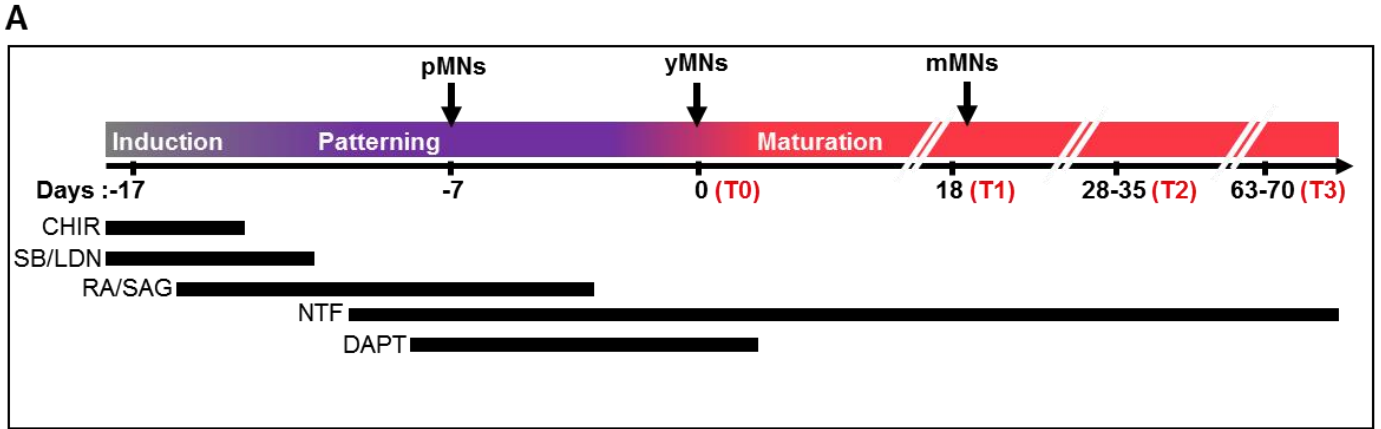


Figure 2. Transcriptome profiling to show the efficient differentiation of iPSC into pure culture of spinal MNs of the lateral motor column.

RNA-seq was performed on differentiated cultures from control, SOD1^{N139D} (2 clones), C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} (3 clones) and TARDBP^{G348C} (2 clones) iPSC at three stages of the differentiation protocol (Fig1A: pMNs, yMNs, mMNs). **A)** Principal component analysis (PCA) shows a time-dependent segregation of samples. **(B-M)** Deseq2 normalized gene expressions in pMNs, yMNs and mMNs of **(B)** *OLIG2*, **(C)** *PAX6* **(D)** *ISLET1*, and **(E)** *HB9*. **(F, G)** yMNs and mMNs express acetylcholinesterase (*ACHE*) and Vesicular acetylcholine transporter (*VACHT*), specific neurotransmitter synthase and transporter of spinal MNs. **(H, I)** All differentiated MN cultures are devoid of glial cells. Very low levels of *GFAP* and *MBP* are detected. **(J, K)** MNs express HOX-C4, C5 and C6 genes, typical of the rostral spinal cord. They do not express HOXC8, a marker of more caudal MNs. **(L, M)** yMNs and mMNs express the transcription factor *FOXP1*, a specific marker of the lateral motor column, but not the *LHX3* gene encoding a transcription factor involved in specification of MNs located in the median motor column.

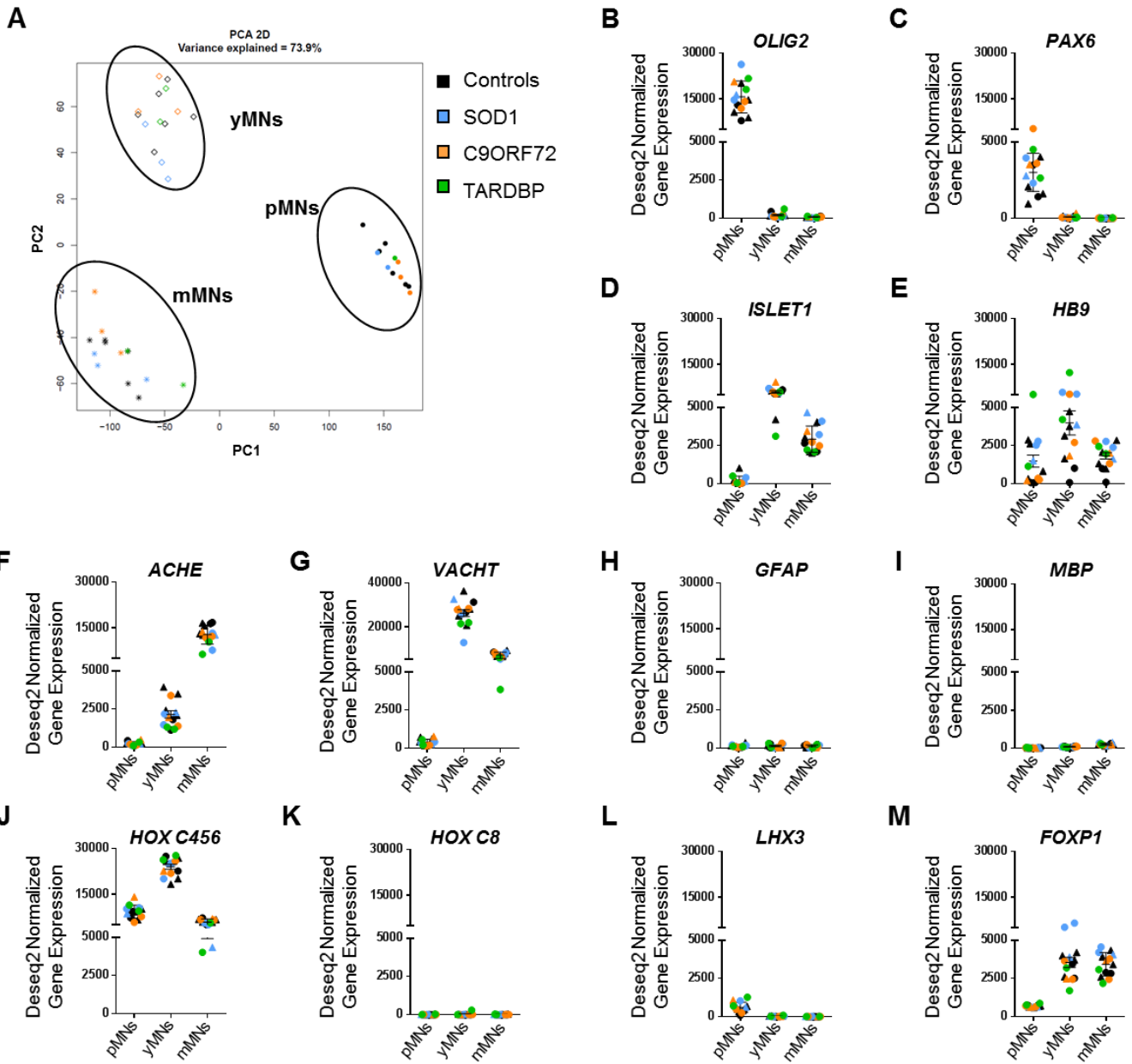


Figure 3. Alterations of electrophysiological properties in ALS motor neurons.

Whole-cell patch-clamp recordings of iPSC-derived MNs from control subjects and ALS patients after 4-5 weeks and 9-10 weeks of culture (T2 and T3, respectively). n = number of recorded MNs. Controls (Ctrl11, Ctrl69-1, Ctrl69-2): T2, n = 51; T3, n = 74; SOD1 (SOD1-2): T2, n = 18; T3, n = 15), C9ORF72 (¹C9ORF72-1): T2, n = 24; T3, n = 22; TARDBP (TARDBP-1): T2, n = 17; T3, n = 21. **(A-G)** Current-clamp recordings. **(A)** Four AP firing patterns were observed among iPSC-derived MNs in response to injected currents (step 1s, 5-100 pA): repetitive (in blue), adaptive (in black), one spike (in pink), none (in grey). **(B)** Percentages of MNs per firing pattern at T2 and T3. At both time points almost all recorded control and mutant ALS MNs were electrically active. White numbers represent percentages of MNs firing each of the 4 patterns. Statistical significance for C9ORF72 MNs by a Fisher's exact test between T2 and T3, for the "repetitive + adaptive" PA firing category (Adjusted P-value. $\phi_p < 0.05$). **(C)** Resting membrane potential (RMP), **(D)** AP Half width, **(E)** AP threshold, **(F)** Rheobase, **(G)** Maximum Frequency. **(H-J)** Voltage-clamp recordings. **(H)** Ratio of $\text{Na}^{+(\text{peak})}$ and $\text{K}^{+(\text{low})}$ current densities during voltage steps of various amplitudes. **(I)** $\text{Na}^{+(\text{peak})}$ current density. **(J)** $\text{K}^{+(\text{low})}$ current density. **(C-J)** Mann-Whitney test ($\phi_p < 0.05$; $\phi\phi_p < 0.01$; $\phi\phi\phi_p < 0.001$) between T2 and T3 (ϕ).

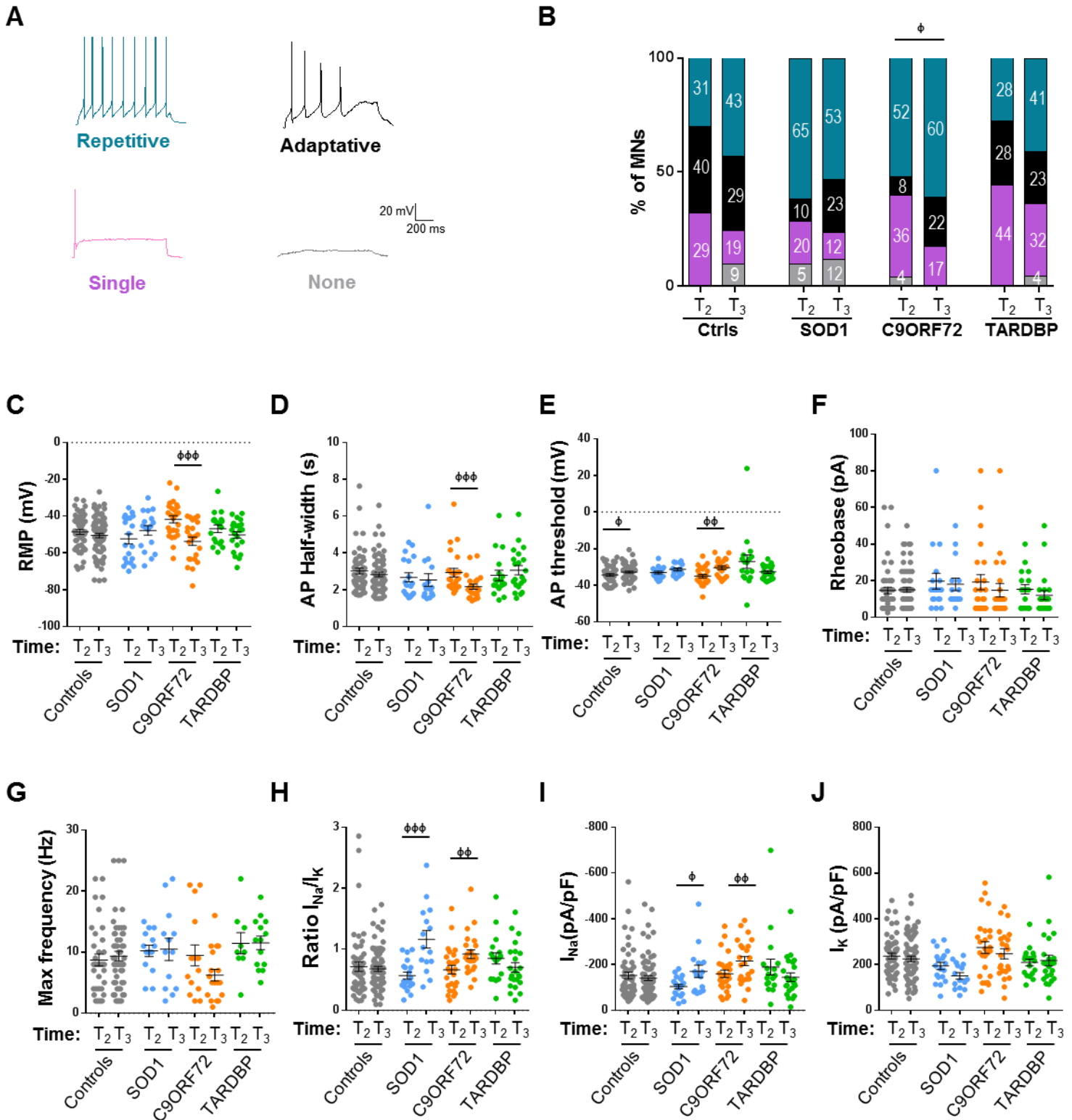


Figure 4. Abnormal protein accumulations in ALS iPSC-derived MNs.

(A) Images of immunostaining of control and SOD1 iPSC-derived MNs with SOD1 antibodies showing specific SOD1 aggregates in neurites of mutant MNs at T1 (arrows) (n = 3 independent experiments). Scale bars: 10 μ m. (B-C) Images of control and TARDBP^{G348C} iPSC-derived MNs co-stained with antibodies against β 3-Tubulin (TUJ1) and either TDP43 (B) or phosphorylated TDP43 (pTDP43) showing nuclear TDP43 localization with rare nuclear TDP43 and cytoplasmic pTDP43 inclusions, only at T2. Arrows in insets indicate inclusions. (n = 3 independent experiments). Scale bars: 20 μ m. (D) Control and ALS iPSC-derived MNs co-labelled with antibodies against cystatin C (CST3) and TUJ1 showing specific cytoplasmic (arrows) and neuritic (arrowheads) accumulation of cystatin C, at T1. Scale bars: 20 μ m. (E) Quantifications of somatic cystatin C (CysC) staining showing significant accumulation in mutant *C9ORF72* and *TARDBP* mMNs. (mean \pm SEM). Statistical significance shown either between ALS and control MNs (*) or between mutant *C9ORF72* and *TARDBP* MNs (ϕ), by Kruskal-Wallis with Dunn's test (****p<0.0001, ϕ p<0.05). n = number of analyzed MNs from 3 independent experiments. Controls (Ctrl33, Ctrl69-2) n = 204; SOD1^{N139D} (SOD1-1, SOD1-2) n = 194; *C9ORF72*^{(G4C2)ⁿ} (¹C9ORF72-1, ²C9ORF72-2) n = 210; TARDBP^{G348C} (TARDBP-1, TARDBP-3) n=117.

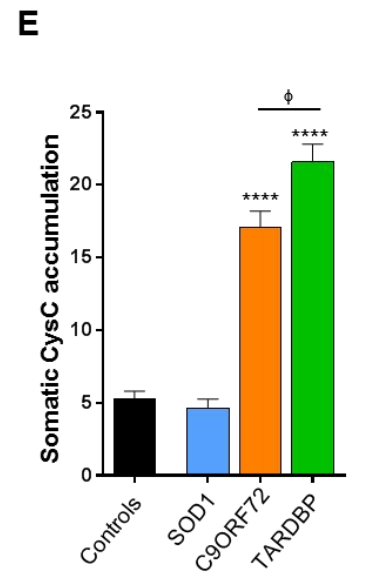
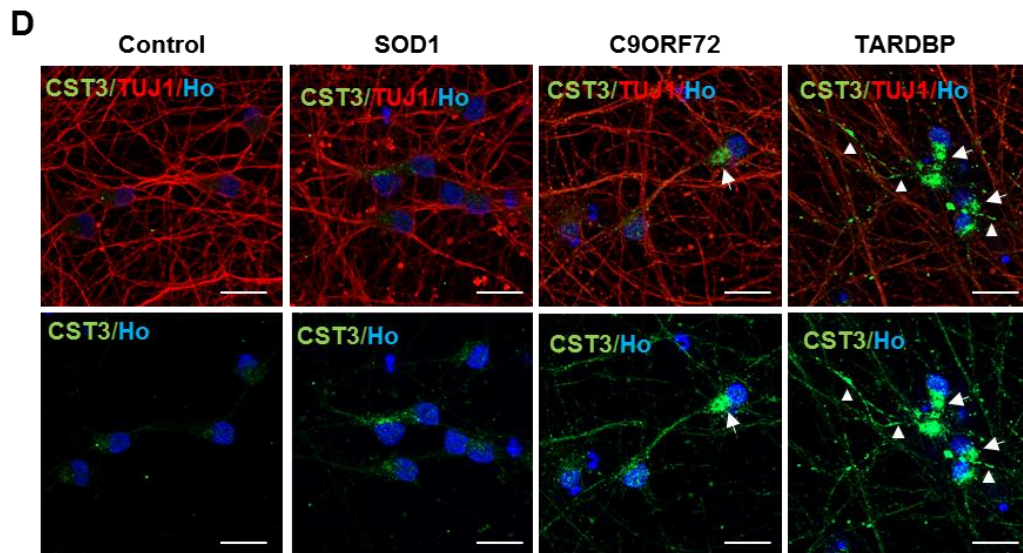
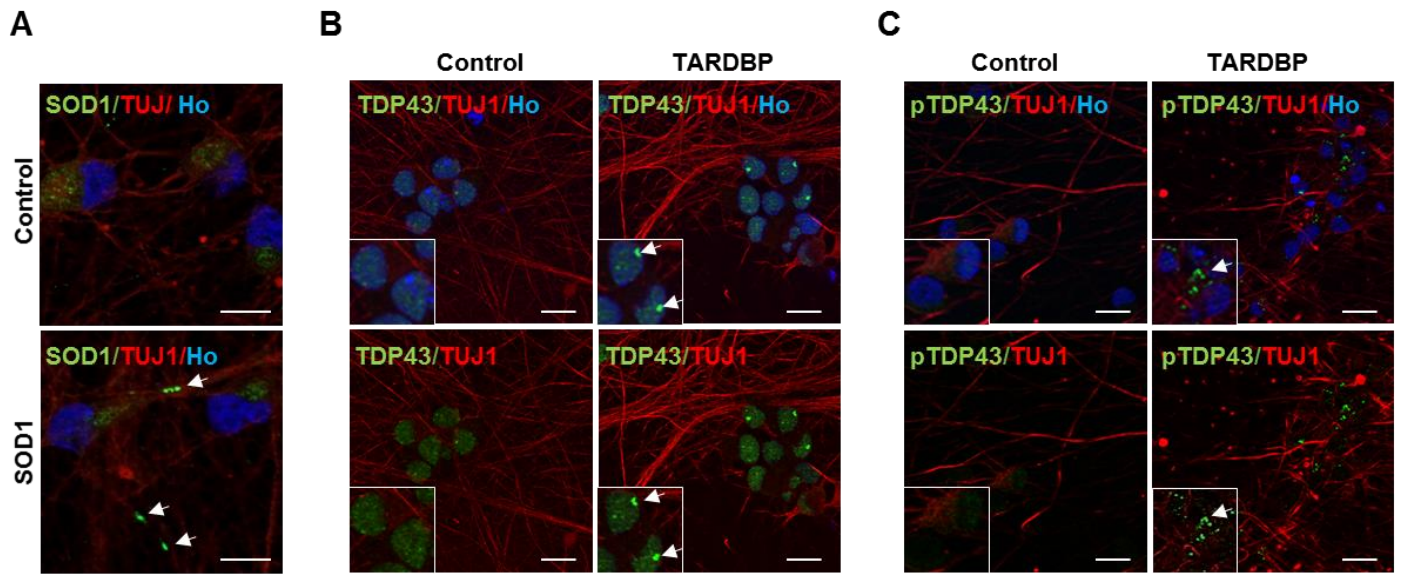


Figure 5. Neurofilament accumulations in ALS iPSc-derived MNs.

(A) Representative phase contrast images of control, SOD1^{N139D}, C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} and TARDBP^{G348C} iPSc-derived MNs at T1. Insets and arrows show specific bead-like structures in neurites (Scale bars: 10 μ m). (B, C) Control and ALS iPSc-derived MNs were labelled at T1 with antibodies against (B) the Light neurofilament subunit NF-L or (C) the phosphorylated Medium/High neurofilament subunits pNF-M/H. Representative images show cytoplasmic accumulations (arrows), neuritic NF-L positive beads (arrowheads) and pNF-M/H proximal axon accumulations (arrows). Scale bars: 10 μ m. (D-E) Quantifications of (D) somatic NF-L and (E) neuritic pNF-M/H staining in the different MN cultures show significant differences between controls and either SOD1^{N139D} or C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} MNs (mean \pm SEM). Statistical significance by Mann-Whitney test (*p<0.05; ***p<0.001,). n = number of independent experiments. For NF-L: Controls (Ctrl33, Ctrl69-1, Ctrl69-2): n = 8; SOD1 (SOD1-1, SOD1-2) n = 6; C9ORF72 (¹C9ORF72-1, ²C9ORF72-2) n = 6; TARDBP (TARDBP-1, TARDBP-3): n=4. For pNF-M/H: Controls (Ctrl33, Ctrl69-1, Ctrl69-2): n = 4; SOD1 (SOD1-1, SOD1-2) n = 4; C9ORF72 (¹C9ORF72-1, ²C9ORF72-2) n = 5; TARDBP (TARDBP-1, TARDBP-3) n=5. (F-I) pNFs staining and Hematoxylin counterstaining of ALS patients' spinal cord sections. (F) Low magnification images showing loss of MNs and irregular calibers of remaining MNs in the anterior horn of the spinal cord of a SOD1^{D83G} patient (top image) when compared to sensitive neurons of the posterior horn (bottom image)(100X). (G-I) Top and bottom images: Higher magnification images of anterior horns of spinal cords of (G) a SOD1^{D83G} patient, (H) a patient with C4G2 expansions and (I) a TARDBP^{G348V} patient. Arrows show different patterns of pNF stainings with more or less large and dense axonal beads, pNF-positive neurites proximal to soma, or more elongated staining of NFs larger than expected (200X).

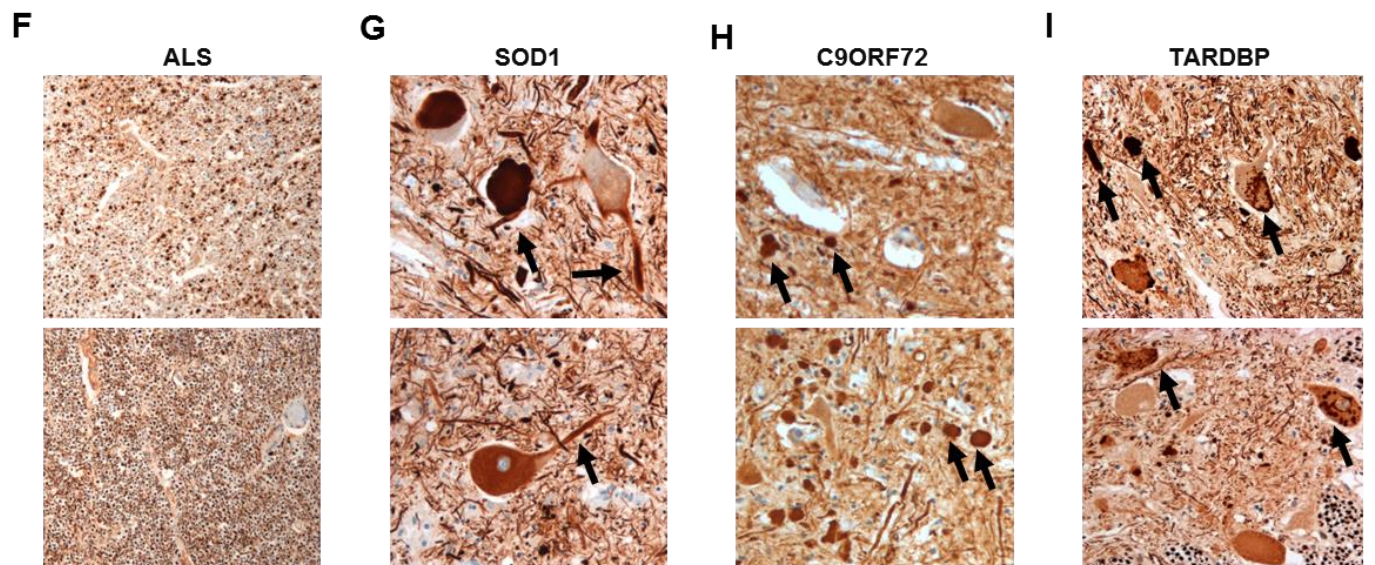
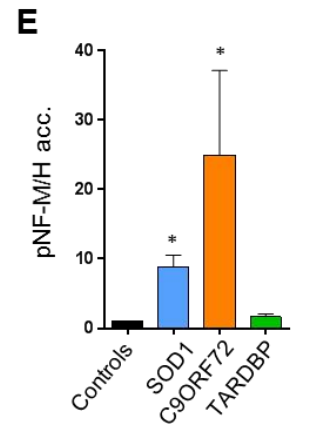
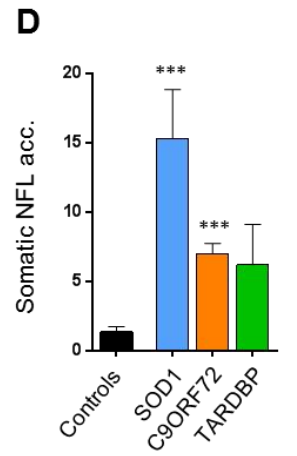
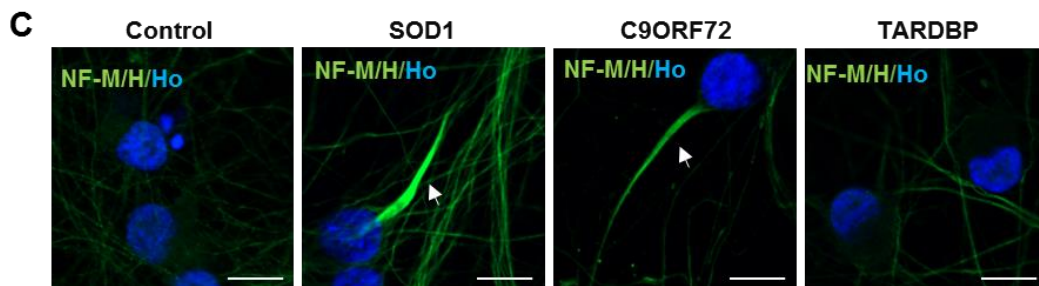
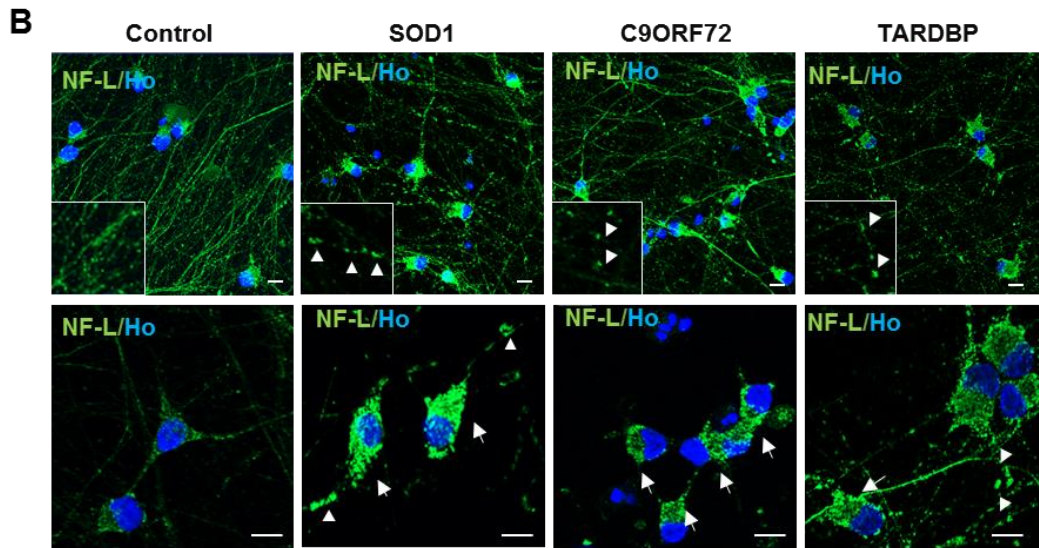
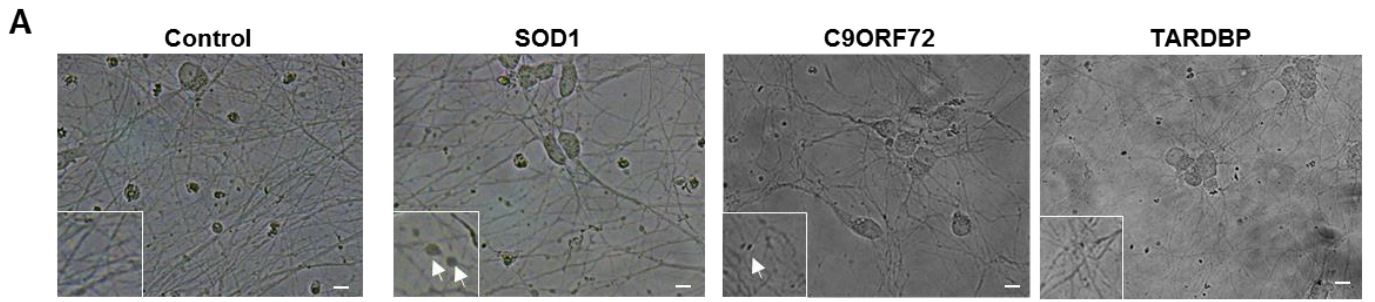


Figure 6. Early alterations of the structural integrity of proximal axonal regions in SOD1 and C9ORF72 iPSC-derived MNs.

(A, B) Representative images of MN cultures co-immunostained with antibodies against pNF-M/H, MAP2 and AnkG, to identify pNFs accumulation (arrows), MAP2-positive dendrites and AnkG-positive AIS, respectively. Scale bars: 20 μ m. A confocal image of pNF-M/H accumulation is shown in (B). Scale bars: 10 μ m. (C) Representative images of iPSC-derived MNs with or without pNF-M/H accumulations (acc.). MNs were co-labelled with antibodies against pNF-M/H, AnkG, and panNav which stain voltage-gated sodium channels. Dotted lines indicate soma localization and pNF-M/H accumulation is indicated with an arrow. The different parameters measured on similar images acquired in the different MN cultures are shown in graphs D to N (See material and Methods). Scale bars: 10 μ m. (D-E) Graphs showing soma areas and AIS lengths. (F-H) pNF-M/H integrated density measured (F) between the soma and the end of the AIS, (G) in the GAP and (H) in the AIS regions. (I-J) PanNav integrated density measured (I) between the soma and the end of the AIS and (J) in the GAP. (K) Ratio of panNav integrated density in the AIS to the GAP. See also Supplementary Fig. S8A. (L-N) Graphs showing GAP length, GAP mean diameter and AIS mean diameter. Accumulation of pNF-M/H modify AIS localization and mean axonal caliber. (mean \pm SEM). Statistical significance shown either between ALS and control MNs (*) or between MNs with or without accumulation (ϕ) by Kruskal-Wallis with Dunn's test (ϕ p<0.05, **p<0.01, ****/ ϕ ϕ ϕ p<0.0001). n = number of analyzed MNs. > 3 independent experiments per subject. Controls (Ctrl33, Ctrl69-2): n = 81 (without acc.); SOD1 (SOD1-1, SOD1-2): n = 72 (with acc.) / n = 68 (without acc.); C9ORF72 (¹C9ORF72-1, ²C9ORF72-2): n = 63 (with acc.) / n = 71 (without acc.). TARDBP (TARDBP-1, TARDBP-2): n = 64 (without acc.). (O) Schematic representation of pNF-M/H accumulation and consequences on AH and AIS. Interestingly, only few MNs with accumulation were without GAP regions when compared to controls (**Supplementary Fig. S8D**). (The image is constructed based on the images from Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>)).

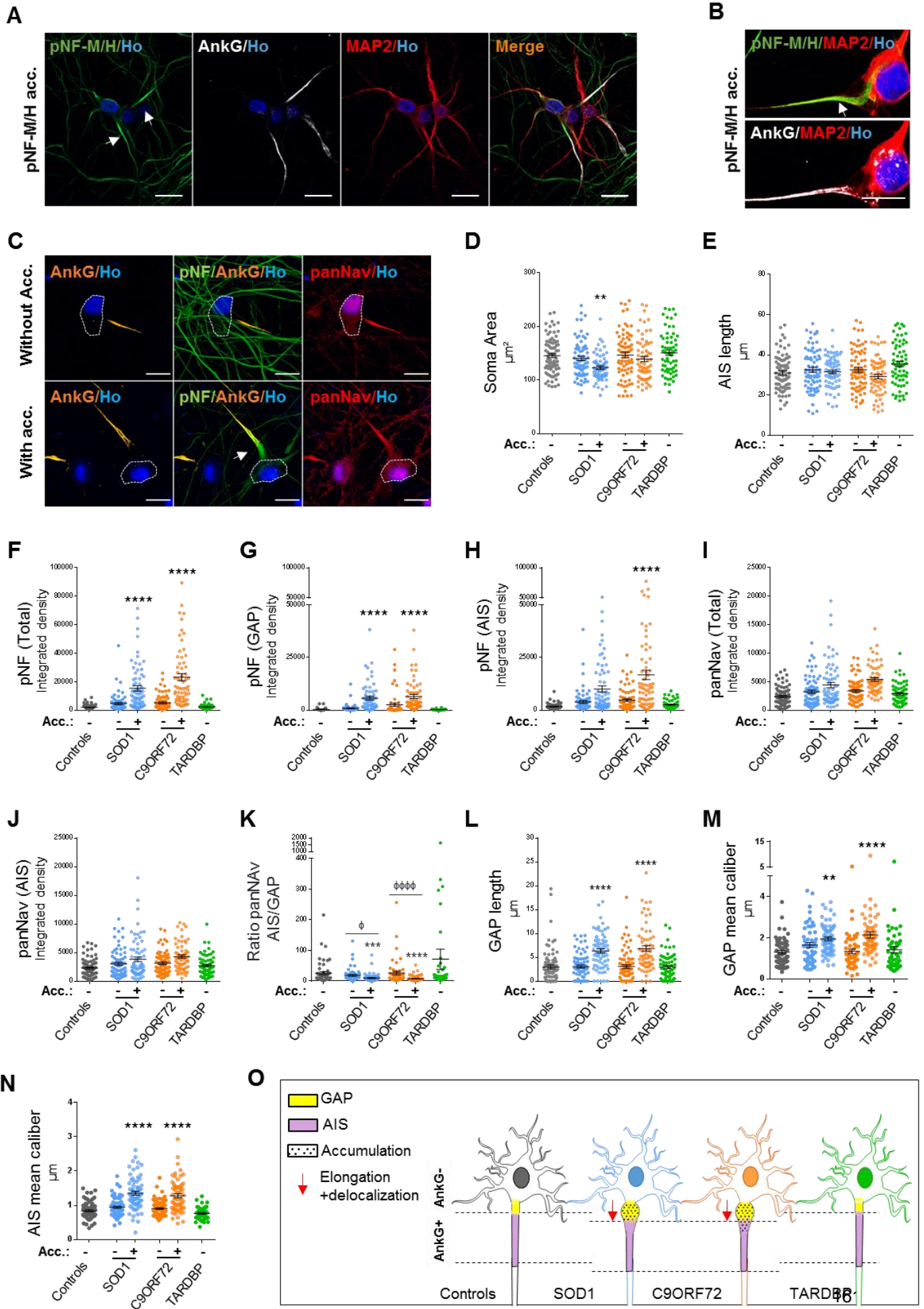
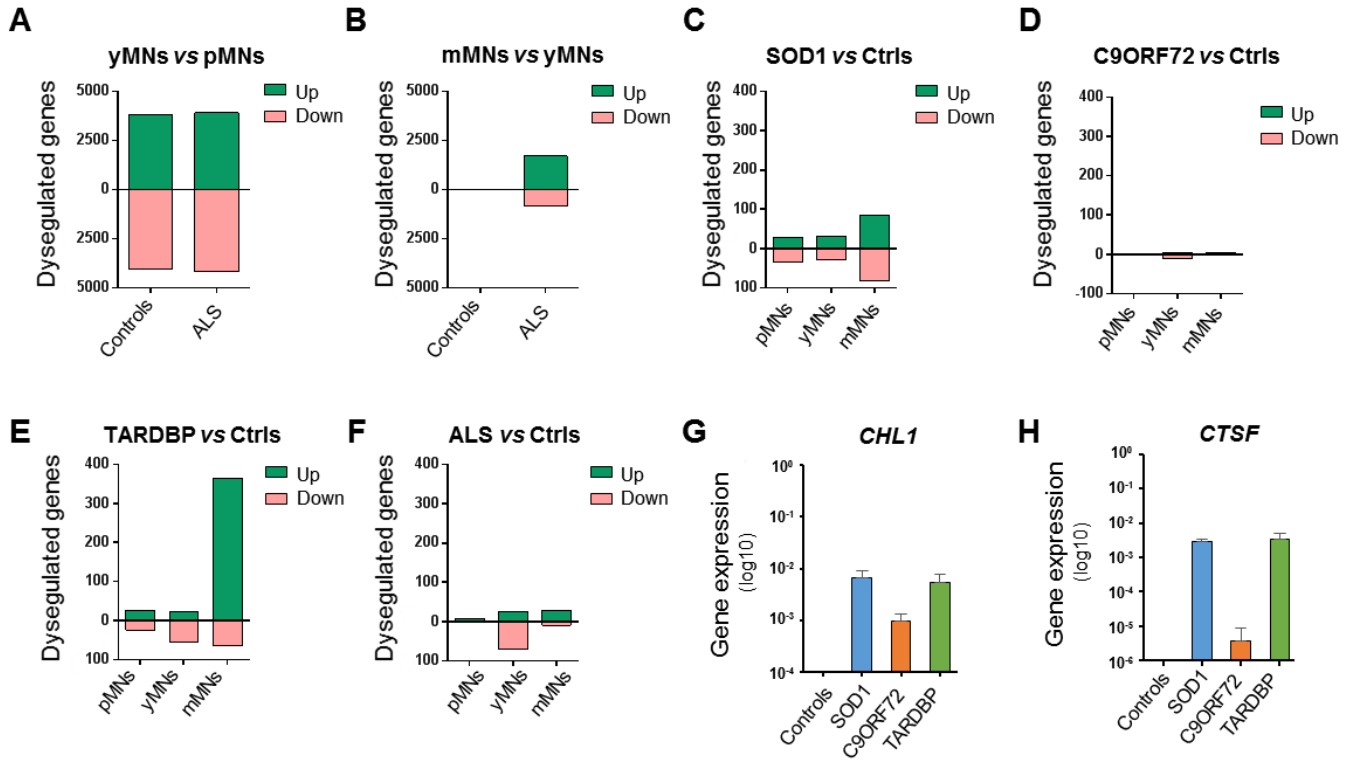


Figure 7. RNA-seq analysis of ALS and control iPSC-derived MNs

(A,B) Number of differentially regulated genes, upregulated or downregulated, in yMNs compared to pMNs (A) and in pMNs compared to mMNs (B) in controls and ALS MNs. (C-F) Number of differentially regulated genes, upregulated or downregulated, in SOD1^{N139D}, C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} and TARDBP^{G348C} or all ALS MNs versus control MNs, in pMNs, yMNs and MMNs. (G-H) Q-PCR analysis show deregulation of *CHLI* (G) and *CTSF* (H) gene expression in SOD1^{N139D}, C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} and TARDBP^{G348C} MNs in pMNs.



References

- Ackerley, S., Grierson, A.J., Banner, S., Perkinton, M.S., Brownlees, J., Byers, H.L., Ward, M., Thornhill, P., Hussain, K., Waby, J.S., et al. (2004). p38alpha stress-activated protein kinase phosphorylates neurofilaments and is associated with neurofilament pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 354–364.
- Allodi, I., and Hedlund, E. (2014). Directed midbrain and spinal cord neurogenesis from pluripotent stem cells to model development and disease in a dish. *Frontiers in Neuroscience* 8.
- Amoroso, M.W., Croft, G.F., Williams, D.J., O’Keeffe, S., Carrasco, M.A., Davis, A.R., Roybon, L., Oakley, D.H., Maniatis, T., Henderson, C.E., et al. (2013). Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells. *J Neurosci* 33, 574–586.
- Arnold, E.S., Ling, S.-C., Huelga, S.C., Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Ditsworth, D., Kordasiewicz, H.B., McAlonis-Downes, M., Platoshyn, O., Parone, P.A., et al. (2013). ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E736-745.
- Bellingham, M.C. (2011). A Review of the Neural Mechanisms of Action and Clinical Efficiency of Riluzole in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis: What have we Learned in the Last Decade? *CNS Neuroscience & Therapeutics* 17, 4–31.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N. Engl. J. Med.* 330, 585–591.
- Bhingre, A., Namboori, S.C., Zhang, X., VanDongen, A.M.J., and Stanton, L.W. (2017). Genetic Correction of SOD1 Mutant iPSCs Reveals ERK and JNK Activated AP1 as a Driver of Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Stem Cell Reports* 8, 856–869.
- Bilican, B., Serio, A., Barmada, S.J., Nishimura, A.L., Sullivan, G.J., Carrasco, M., Phatnani, H.P., Puddifoot, C.A., Story, D., Fletcher, J., et al. (2012). Mutant induced

pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 5803–5808.

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

Bohl, D., Pochet, R., Mitrecic, D., and Nicaise, C. (2016). Modelling and treating amyotrophic lateral sclerosis through induced-pluripotent stem cells technology. *Curr Stem Cell Res Ther* 11, 301–312.

Bories, C., Amendola, J., Lamotte d'Incamps, B., and Durand, J. (2007). Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience* 25, 451–459.

Bostock, H., Sharief, M.K., Reid, G., and Murray, N.M. (1995). Axonal ion channel dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 118 (Pt 1), 217–225.

Budini, M., Buratti, E., Stuani, C., Guarnaccia, C., Romano, V., De Conti, L., and Baralle, F.E. (2012). Cellular Model of TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) Aggregation Based on Its C-terminal Gln/Asn-rich Region. *J Biol Chem* 287, 7512–7525.

Buffington, S.A., and Rasband, M.N. (2011). The axon initial segment in nervous system disease and injury. *Eur J Neurosci* 34, 1609–1619.

Buhusi, M., Midkiff, B.R., Gates, A.M., Richter, M., Schachner, M., and Maness, P.F. (2003). Close homolog of L1 is an enhancer of integrin-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.* 278, 25024–25031.

Burkhardt, M.F., Martinez, F.J., Wright, S., Ramos, C., Volfson, D., Mason, M., Garnes, J., Dang, V., Lievers, J., Shoukat-Mumtaz, U., et al. (2013). A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* 56, 355–364.

Chen, H., Qian, K., Du, Z., Cao, J., Petersen, A., Liu, H., Blackbourn, L.W., Huang, C.-L., Errigo, A., Yin, Y., et al. (2014). Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell* 14, 796–809.

Côté, F., Collard, J.F., and Julien, J.P. (1993). Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 73, 35–46.

Couillard-Després, S., Zhu, Q., Wong, P.C., Price, D.L., Cleveland, D.W., and Julien, J.-P. (1998). Protective effect of neurofilament heavy gene overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 9626–9630.

Dafinca, R., Scaber, J., Ababneh, N., Lalic, T., Weir, G., Christian, H., Vowles, J., Douglas, A.G.L., Fletcher-Jones, A., Browne, C., et al. (2016). C9orf72 Hexanucleotide Expansions Are Associated with Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *STEM CELLS* 34, 2063–2078.

Dangond, F., Hwang, D., Camelo, S., Pasinelli, P., Frosch, M.P., Stephanopoulos, G., Stephanopoulos, G., Brown, R.H., and Gullans, S.R. (2004). Molecular signature of late-stage human ALS revealed by expression profiling of postmortem spinal cord gray matter. *Physiol. Genomics* 16, 229–239.

Devlin, A.-C., Burr, K., Borooah, S., Foster, J.D., Cleary, E.M., Geti, I., Vallier, L., Shaw, C.E., Chandran, S., and Miles, G.B. (2015). Human iPSC-derived motoneurons harbouring TARDBP or C9ORF72 ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability. *Nature Communications* 6, 5999.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.

Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., et al. (2012). Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Science Translational Medicine* 4, 145ra104–145ra104.

Enjin, A., Rabe, N., Nakanishi, S.T., Vallstedt, A., Gezelius, H., Memic, F., Lind, M., Hjalt, T., Tourtellotte, W.G., Bruder, C., et al. (2010). Identification of novel spinal cholinergic

genetic subtypes disclose Chodl and Pitx2 as markers for fast motor neurons and partition cells. *The Journal of Comparative Neurology* 518, 2284–2304.

Feneberg, E., Oeckl, P., Steinacker, P., Verde, F., Barro, C., Van Damme, P., Gray, E., Grosskreutz, J., Jardel, C., Kuhle, J., et al. (2017). Multicenter evaluation of neurofilaments in early symptom onset amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*.

Fujimori, K., Ishikawa, M., Otomo, A., Atsuta, N., Nakamura, R., Akiyama, T., Hadano, S., Aoki, M., Saya, H., Sobue, G., et al. (2018). Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nature Medicine*.

Gaiani, A., Martinelli, I., Bello, L., Querin, G., Puthenparampil, M., Ruggero, S., Toffanin, E., Cagnin, A., Briani, C., Pegoraro, E., et al. (2017). Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Neurofilament Light Chain Levels in Definite Subtypes of Disease. *JAMA Neurol* 74, 525–532.

Gautier, C.A., Erpapazoglou, Z., Mouton-Liger, F., Muriel, M.P., Cormier, F., Bigou, S., Duffaure, S., Girard, M., Foret, B., Iannielli, A., et al. (2016). The endoplasmic reticulum-mitochondria interface is perturbed in PARK2 knockout mice and patients with PARK2 mutations. *Hum. Mol. Genet.* 25, 2972–2984.

Ghasemi, M., and Brown, R.H. (2018). Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8, a024125.

Gouti, M., Tsakiridis, A., Wymeersch, F.J., Huang, Y., Kleinjung, J., Wilson, V., and Briscoe, J. (2014). In Vitro Generation of Neuromesodermal Progenitors Reveals Distinct Roles for Wnt Signalling in the Specification of Spinal Cord and Paraxial Mesoderm Identity. *PLoS Biol* 12.

Gregory, J.M., Barros, T.P., Meehan, S., Dobson, C.M., and Luheshi, L.M. (2012). The Aggregation and Neurotoxicity of TDP-43 and Its ALS-Associated 25 kDa Fragment Are Differentially Affected by Molecular Chaperones in *Drosophila*. *PLoS One* 7.

Guo, W., Naujock, M., Fumagalli, L., Vandoorne, T., Baatsen, P., Boon, R., Ordovás, L., Patel, A., Welters, M., Vanwelden, T., et al. (2017). HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients. *Nature Communications* 8.

Guseva, D., Jakovcevski, I., Irintchev, A., Leshchyns'ka, I., Sytnyk, V., Ponimaskin, E., and Schachner, M. (2018). Cell Adhesion Molecule Close Homolog of L1 (CHL1) Guides the Regrowth of Regenerating Motor Axons and Regulates Synaptic Coverage of Motor Neurons. *Front Mol Neurosci* 11.

Higelin, J., Demestre, M., Putz, S., Delling, J.P., Jacob, C., Lutz, A.-K., Bausinger, J., Huber, A.-K., Klingenstein, M., Barbi, G., et al. (2016). FUS Mislocalization and Vulnerability to DNA Damage in ALS Patients Derived hiPSCs and Aging Motoneurons. *Front Cell Neurosci* 10.

Howells, J., Matamala, J.M., Park, S.B., Garg, N., Vucic, S., Bostock, H., Burke, D., and Kiernan, M.C. (2018). In vivo evidence for reduced ion channel expression in motor axons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol. (Lond.)*.

Hsu, W.-C.J., Nilsson, C.L., and Laezza, F. (2014). Role of the Axonal Initial Segment in Psychiatric Disorders: Function, Dysfunction, and Intervention. *Front Psychiatry* 5.

Huang, C.Y.-M., and Rasband, M.N. (2018). Axon initial segments: structure, function, and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1420, 46–61.

Ichiyanagi, N., Fujimori, K., Yano, M., Ishihara-Fujisaki, C., Sone, T., Akiyama, T., Okada, Y., Akamatsu, W., Matsumoto, T., Ishikawa, M., et al. (2016). Establishment of In Vitro FUS-Associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 6, 496–510.

Imamura, K., Izumi, Y., Watanabe, A., Tsukita, K., Woltjen, K., Yamamoto, T., Hotta, A., Kondo, T., Kitaoka, S., Ohta, A., et al. (2017). The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med* 9.

International Stem Cell Banking Initiative (2009). Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem Cell Rev* 5, 301–314.

Iwai, Y., Shibuya, K., Misawa, S., Sekiguchi, Y., Watanabe, K., Amino, H., and Kuwabara, S. (2016). Axonal Dysfunction Precedes Motor Neuronal Death in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* 11.

- Johnson, B.S., McCaffery, J.M., Lindquist, S., and Gitler, A.D. (2008). A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6439–6444.
- Jones, S.L., and Svitkina, T.M. (2016). Axon Initial Segment Cytoskeleton: Architecture, Development, and Role in Neuron Polarity. *Neural Plast* 2016.
- Juneja, T., Pericak-Vance, M.A., Laing, N.G., Dave, S., and Siddique, T. (1997). Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu,Zn superoxide dismutase. *Neurology* 48, 55–57.
- Kanai, K., Kuwabara, S., Misawa, S., Tamura, N., Ogawara, K., Nakata, M., Sawai, S., Hattori, T., and Bostock, H. (2006). Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain* 129, 953–962.
- Kanning, K.C., Kaplan, A., and Henderson, C.E. (2010). Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annual Review of Neuroscience* 33, 409–440.
- Kato, S. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica* 115, 97–114.
- Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L.A., Boulting, G.L., Moccia, R., Wainger, B.J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., et al. (2014). Pathways Disrupted in Human ALS Motor Neurons Identified through Genetic Correction of Mutant SOD1. *Cell Stem Cell* 14, 781–795.
- Kong, J., and Xu, Z. (2000). Overexpression of neurofilament subunit NF-L and NF-H extends survival of a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 281, 72–74.
- Laferrriere, F., and Polymenidou, M. (2015). Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Swiss Medical Weekly*.
- Lemonnier, T., Blanchard, S., Toli, D., Roy, E., Bigou, S., Froissart, R., Rouvet, I., Vitry, S., Heard, J.M., and Bohl, D. (2011). Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3653–3666.

Lenzi, J., De Santis, R., de Turris, V., Morlando, M., Laneve, P., Calvo, A., Caliendo, V., Chiò, A., Rosa, A., and Bozzoni, I. (2015). ALS mutant FUS proteins are recruited into stress granules in induced pluripotent stem cell-derived motoneurons. *Dis Model Mech* 8, 755–766.

Leterrier, C. (2016). The Axon Initial Segment, 50Years Later: A Nexus for Neuronal Organization and Function. *Curr Top Membr* 77, 185–233.

Leterrier, C. (2018). The Axon Initial Segment: An Updated Viewpoint. *The Journal of Neuroscience* 38, 2135–2145.

Liu, X., Chen, J., liu, W., Li, X., Chen, Q., Liu, T., Gao, S., and Deng, M. (2015). The fused in sarcoma protein forms cytoplasmic aggregates in motor neurons derived from integration-free induced pluripotent stem cells generated from a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the FUS-P525L mutation. *Neurogenetics* 16, 223–231.

Lopez-Gonzalez, R., Lu, Y., Gendron, T.F., Karydas, A., Tran, H., Yang, D., Petrucelli, L., Miller, B.L., Almeida, S., and Gao, F.-B. (2016). Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron* 92, 383–391.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.

Maglemose, R., Hedegaard, A., Lehnhoff, J., Dimintyanova, K.P., Moldovan, M., Grøndahl, L., and Meehan, C.F. (2017). Potassium channel abnormalities are consistent with early axon degeneration of motor axons in the G127X SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 292, 154–167.

Marchetto, M.C.N., Muotri, A.R., Mu, Y., Smith, A.M., Cezar, G.G., and Gage, F.H. (2008). Non-Cell-Autonomous Effect of Human SOD1G37R Astrocytes on Motor Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 649–657.

Martínez-Silva, M. de L., Imhoff-Manuel, R.D., Sharma, A., Heckman, C.J., Shneider, N.A., Roselli, F., Zytnicki, D., and Manuel, M. (2018). Hypoexcitability precedes denervation in the large fast-contracting motor units in two unrelated mouse models of ALS.

Mathews, P.M., and Levy, E. (2016). Cystatin C in aging and in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 32, 38–50.

Maury, Y., Côme, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., and Nedelec, S. (2015). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat. Biotechnol.* 33, 89–96.

Millecamps, S., Salachas, F., Cazeneuve, C., Gordon, P., Bricka, B., Camuzat, A., Guillot-Noël, L., Russaouen, O., Bruneteau, G., Pradat, P.-F., et al. (2010). SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype–phenotype correlations. *Journal of Medical Genetics* 47, 554–560.

Millecamps, S., Boillée, S., Le Ber, I., Seilhean, D., Giraudeau, M., Moigneu, C., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Corcia, P., Pradat, P.-F., et al. (2012). Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes. *Journal of Medical Genetics* 49, 258–263.

Mizuno, Y., Amari, M., Takatama, M., Aizawa, H., Mihara, B., and Okamoto, K. (2006). Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 112, 597–603.

Mori, F., Tanji, K., Miki, Y., and Wakabayashi, K. (2009). Decreased cystatin C immunoreactivity in spinal motor neurons and astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 68, 1200–1206.

Nägler, D.K., Sulea, T., and Ménard, R. (1999). Full-Length cDNA of Human Cathepsin F Predicts the Presence of a Cystatin Domain at the N-terminus of the Cysteine Protease Zymogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257, 313–318.

Naujock, M., Stanslowsky, N., Bufler, S., Naumann, M., Reinhardt, P., Sternecker, J., Kefalakes, E., Kassebaum, C., Bursch, F., Lojewski, X., et al. (2016). 4-Aminopyridine Induced Activity Rescues Hypoexcitable Motor Neurons from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells: 4AP rescues ALS iPSC derived motor neurons. *STEM CELLS* 34, 1563–1575.

Naumann, M., Pal, A., Goswami, A., Lojewski, X., Japtok, J., Vehlou, A., Naujock, M., Günther, R., Jin, M., Stanslowsky, N., et al. (2018). Impaired DNA damage response

signaling by FUS-NLS mutations leads to neurodegeneration and FUS aggregate formation. *Nature Communications* 9.

Nelson, A.D., and Jenkins, P.M. (2017). Axonal Membranes and Their Domains: Assembly and Function of the Axon Initial Segment and Node of Ranvier. *Front. Cell. Neurosci.* 11.

Nijssen, J., Comley, L.H., and Hedlund, E. (2017). Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133, 863–885.

Noli, L., Capalbo, A., Ogilvie, C., Khalaf, Y., and Ilic, D. (2015). Discordant Growth of Monozygotic Twins Starts at the Blastocyst Stage: A Case Study. *Stem Cell Reports* 5, 946–953.

Ohi, T., Nabeshima, K., Kato, S., Yazawa, S., and Takechi, S. (2004). Familial amyotrophic lateral sclerosis with His46Arg mutation in Cu/Zn superoxide dismutase presenting characteristic clinical features and Lewy body-like hyaline inclusions. *J. Neurol. Sci.* 225, 19–25.

Okamoto, K., Hirai, S., Amari, M., Watanabe, M., and Sakurai, A. (1993). Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis immunostained with rabbit anti-cystatin C serum. *Neurosci. Lett.* 162, 125–128.

Park, S.B., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2017). Axonal Excitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* 14, 78–90.

Patani, R. (2016). Generating Diverse Spinal Motor Neuron Subtypes from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int* 2016.

Pehar, M., Harlan, B.A., Killoy, K.M., and Vargas, M.R. (2017). Role and Therapeutic Potential of Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Pharm Des* 23, 5010–5021.

Quinlan, K.A., Schuster, J.E., Fu, R., Siddique, T., and Heckman, C.J. (2011). Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 2245–2260.

Ravits, J. (2014). Focality, stochasticity and neuroanatomic propagation in ALS pathogenesis. *Experimental Neurology* 262, 121–126.

Ravits, J., Appel, S., Baloh, R.H., Barohn, R., Rix Brooks, B., Elman, L., Floeter, M.K., Henderson, C., Lomen-Hoerth, C., Macklis, J.D., et al. (2013). Deciphering amyotrophic

lateral sclerosis: What phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 14, 5–18.

Riva, N., Clarelli, F., Domi, T., Cerri, F., Gallia, F., Trimarco, A., Brambilla, P., Lunetta, C., Lazzerini, A., Lauria, G., et al. (2016). Unraveling gene expression profiles in peripheral motor nerve from amyotrophic lateral sclerosis patients: insights into pathogenesis. *Scientific Reports* 6.

Rossi, D., Volanti, P., Brambilla, L., Colletti, T., Spataro, R., and Bella, V.L. (2018). CSF neurofilament proteins as diagnostic and prognostic biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 265, 510–521.

Saberi, S., Stauffer, J.E., Schulte, D.J., and Ravits, J. (2015). Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurologic Clinics* 33, 855–876.

Sances, S., Bruijn, L.I., Chandran, S., Eggan, K., Ho, R., Klim, J.R., Livesey, M.R., Lowry, E., Macklis, J.D., Rushton, D., et al. (2016). Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Nature Neuroscience* 16, 542–553.

Sareen, D., O'Rourke, J.G., Meera, P., Muhammad, A.K.M.G., Grant, S., Simpkinson, M., Bell, S., Carmona, S., Ornelas, L., Sahabian, A., et al. (2013). Targeting RNA Foci in iPSC-Derived Motor Neurons from ALS Patients with a C9ORF72 Repeat Expansion. *Science Translational Medicine* 5, 208ra149-208ra149.

Sasaki, S., and Iwata, M. (1996a). Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47, 535–540.

Sasaki, S., and Iwata, M. (1996b). Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 204, 53–56.

Sasaki, S., and Iwata, M. (2007). Mitochondrial Alterations in the Spinal Cord of Patients With Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66, 10–16.

Sasaki, S., and Maruyama, S. (1992). Increase in diameter of the axonal initial segment is an early change in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 110, 114–120.

Sasaki, S., Maruyama, S., Yamane, K., Sakuma, H., and Takeishi, M. (1989). Swellings of proximal axons in a case of motor neuron disease. *Ann. Neurol.* 25, 520–522.

- Sasaki, S., Maruyama, S., Yamane, K., Sakuma, H., and Takeishi, M. (1990). Ultrastructure of swollen proximal axons of anterior horn neurons in motor neuron disease. *Journal of the Neurological Sciences* 97, 233–240.
- Sasaki, S., Warita, H., Abe, K., and Iwata, M. (2005a). Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol.* 110, 48–56.
- Sasaki, S., Warita, H., Murakami, T., Shibata, N., Komori, T., Abe, K., Kobayashi, M., and Iwata, M. (2005b). Ultrastructural study of aggregates in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathologica* 109, 247–255.
- Selvaraj, B.T., Livesey, M.R., Zhao, C., Gregory, J.M., James, O.T., Cleary, E.M., Chouhan, A.K., Gane, A.B., Perkins, E.M., Dando, O., et al. (2018). C9ORF72 repeat expansion causes vulnerability of motor neurons to Ca²⁺-permeable AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Commun* 9.
- Sephton, C.F., Cenik, C., Kucukural, A., Dammer, E.B., Cenik, B., Han, Y., Dewey, C.M., Roth, F.P., Herz, J., Peng, J., et al. (2011). Identification of Neuronal RNA Targets of TDP-43-containing Ribonucleoprotein Complexes. *J Biol Chem* 286, 1204–1215.
- Shi, G.-P., Bryant, R.A.R., Riese, R., Verhelst, S., Driessen, C., Li, Z., Bromme, D., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (2000). Role for Cathepsin F in Invariant Chain Processing and Major Histocompatibility Complex Class II Peptide Loading by Macrophages. *J Exp Med* 191, 1177–1186.
- Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H.X., Hung, W.Y., Kato, T., and Asayama, K. (1996). Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 481–490.
- Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2016). Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews* 32, 22–37.
- Tian, N., Leshchyns'ka, I., Welch, J.H., Diakowski, W., Yang, H., Schachner, M., and Sytnyk, V. (2012). Lipid raft-dependent endocytosis of close homolog of adhesion molecule L1 (CHL1) promotes neuritogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 44447–44463.

- Toli, D., Buttigieg, D., Blanchard, S., Lemonnier, T., Lamotte d'Incamps, B., Bellouze, S., Baillat, G., Bohl, D., and Haase, G. (2015). Modeling amyotrophic lateral sclerosis in pure human iPSc-derived motor neurons isolated by a novel FACS double selection technique. *Neurobiol. Dis.* 82, 269–280.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824, 68–88.
- Van Damme, P., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Disease Models & Mechanisms* 10, 537–549.
- Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2006). Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurophysiology* 117, 1458–1466.
- Wainger, B.J., Kiskinis, E., Mellin, C., Wiskow, O., Han, S.S.W., Sandoe, J., Perez, N.P., Williams, L.A., Lee, S., Boulting, G., et al. (2014). Intrinsic Membrane Hyperexcitability of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Motor Neurons. *Cell Reports* 7, 1–11.
- Westergard, T., Jensen, B.K., Wen, X., Cai, J., Kropf, E., Iacovitti, L., Pasinelli, P., and Trotti, D. (2016). Cell-to-Cell Transmission of Dipeptide Repeat Proteins Linked to C9orf72-ALS/FTD. *Cell Reports* 17, 645–652.
- Wilson, M.E., Boumaza, I., Lacomis, D., and Bowser, R. (2010). Cystatin C: a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 5, e15133.
- Wootz, H., Enjin, A., Wallén-Mackenzie, A., Lindholm, D., and Kullander, K. (2010). Reduced VGLUT2 expression increases motor neuron viability in Sod1(G93A) mice. *Neurobiol. Dis.* 37, 58–66.
- Xiao, S., McLean, J., and Robertson, J. (2006). Neuronal intermediate filaments and ALS: a new look at an old question. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 1001–1012.
- Xu, Z., Cork, L.C., Griffin, J.W., and Cleveland, D.W. (1993a). Involvement of neurofilaments in motor neuron disease. *J. Cell Sci. Suppl.* 17, 101–108.
- Xu, Z., Cork, L.C., Griffin, J.W., and Cleveland, D.W. (1993b). Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73, 23–33.

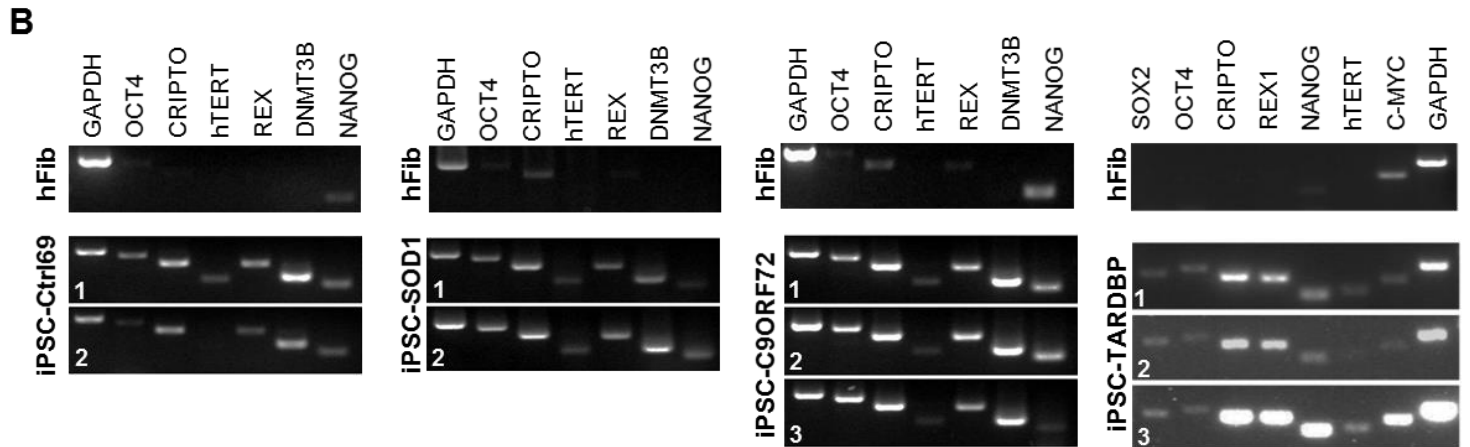
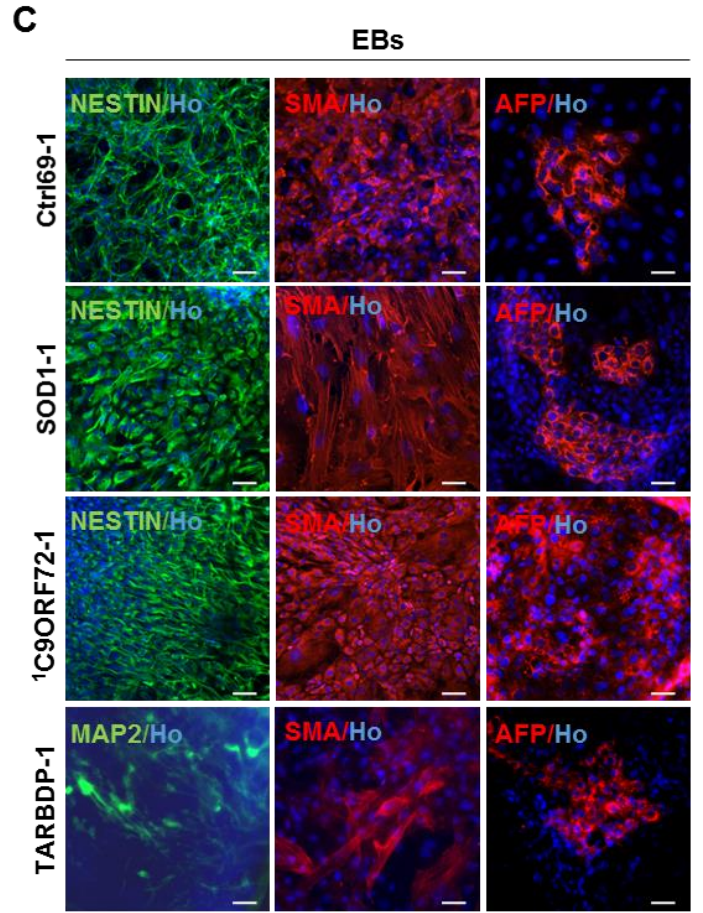
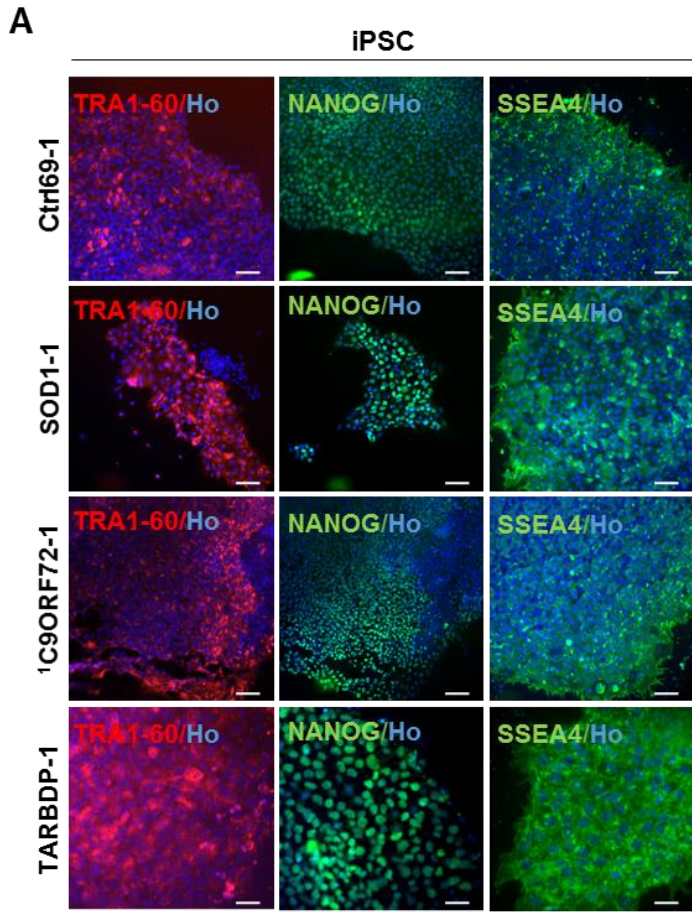
Zhang, Y.-J., Xu, Y.-F., Cook, C., Gendron, T.F., Roettges, P., Link, C.D., Lin, W.-L., Tong, J., Castanedes-Casey, M., Ash, P., et al. (2009). Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7607–7612.

Zhu, Y., Yang, M., Li, F., Li, M., Xu, Z., Yang, F., Liu, Y., Chen, W., Zhang, Y., and Xu, R. (2018). Aberrant Levels of Cystatin C in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Systematic Review and Meta Analysis. *Int J Biol Sci* 14, 1041–1053.

SUPPLEMENTARY DATA

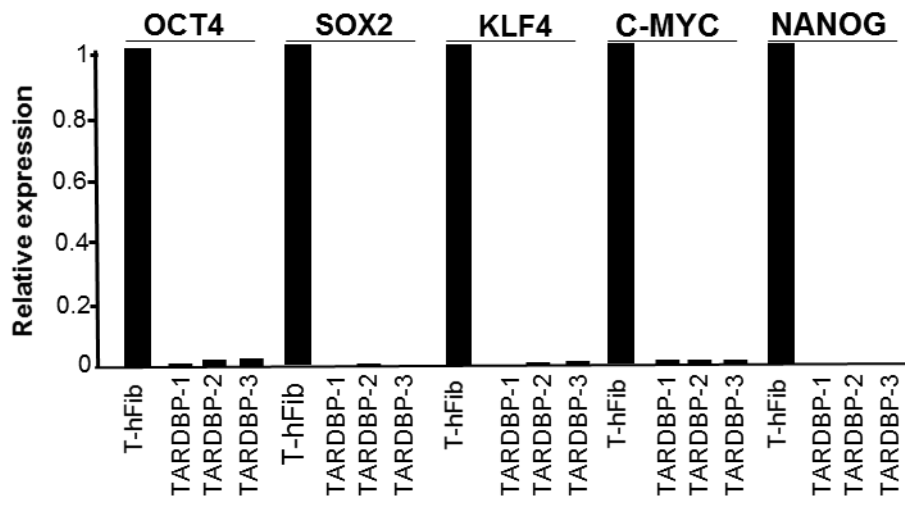
Supplementary Figure S1. Characterization of iPSC clones.

(A) Control and ALS iPSC clones express human pluripotency-associated markers including TRA1-60, NANOG and SSEA4. Representative immuno-staining are shown for one control clone (Ctrl69-1), and three ALS clones (SOD1-1, ¹C9ORF72-1, TARDBP-1). Scale bar: 100µm. (B) RT-PCR show that all iPSC clones express mRNAs coding for endogenous pluripotency-associated genes (OCT4, Crypto, Rex, NANOG, hTERT, c-MYC, DNMTB3). Parental fibroblasts are shown. GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) served as internal control for mRNA detection. (C) Differentiation into the three germ layers in vitro. EBs were grown for 10 days in suspension culture and transferred to coated coverslips for 10 more days. Controls and patients EBs derived from each iPSC clone give rise to cells of ectoderm (Nestin or MAP2), mesoderm (SMA) and endoderm (AFP). Representative images are shown. Scale bars: 50 µm.



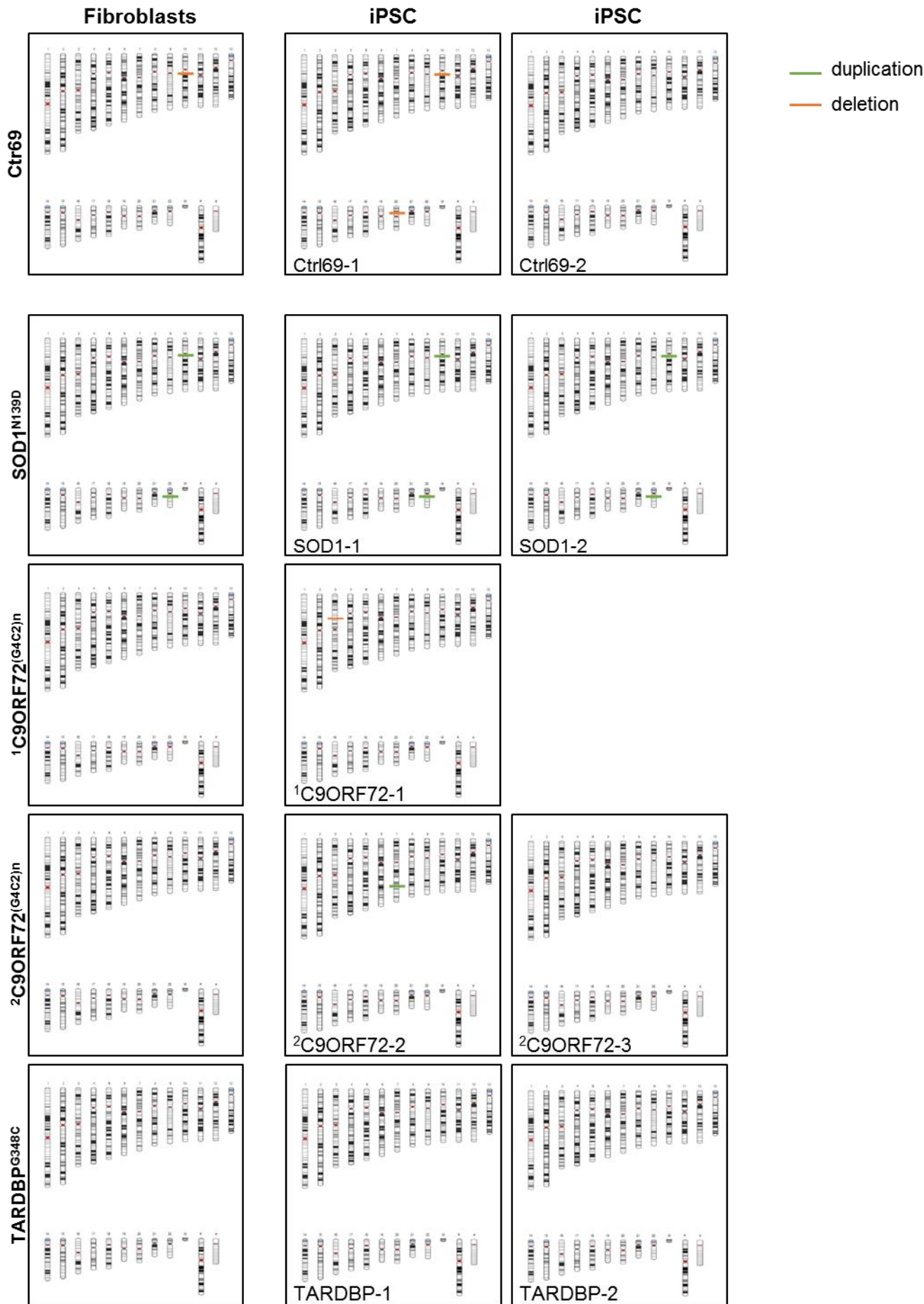
Supplementary Figure S2. Silencing of retroviral vectors in mutant TARDBP clones.

Quantitative PCR after reverse transcription shows that expression of retroviral vector genomes coding for OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC and NANOG was repressed in iPSC clones compared to fibroblasts (T-hFib, value set to 1).



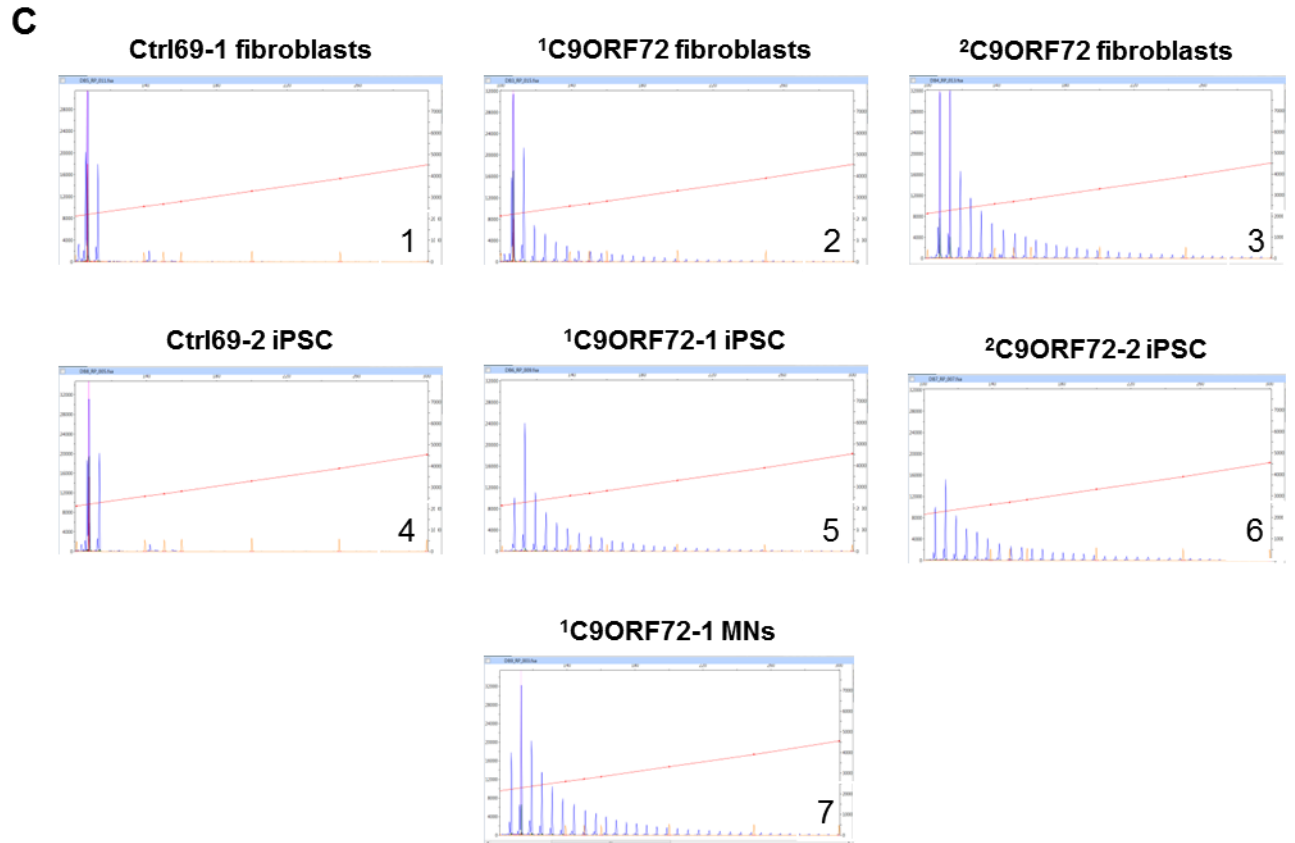
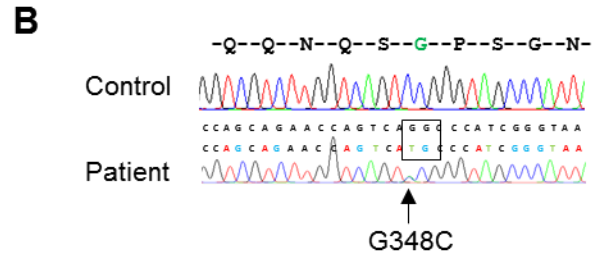
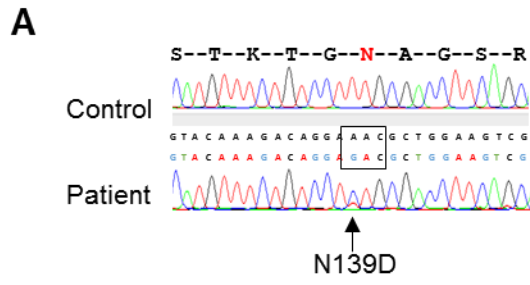
Supplementary Figure S3. SNP Illumina analysis.

Genome integrity was assessed by Illumina Human OmniExpress-24 SNP array and analyzed using GenomeStudio software (Illumina) in both parental fibroblasts and related iPSC clones. Karyograms were produced using KaryoStudio software (Illumina). Amplifications (green) and deletions (orange) are shown alongside the relevant chromosome.



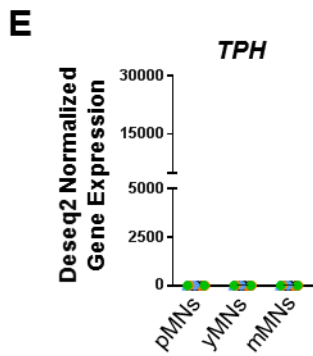
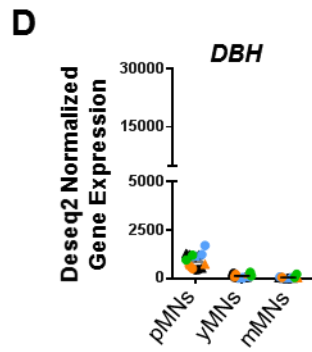
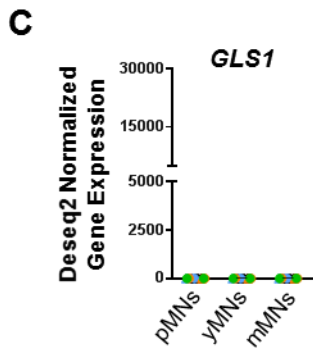
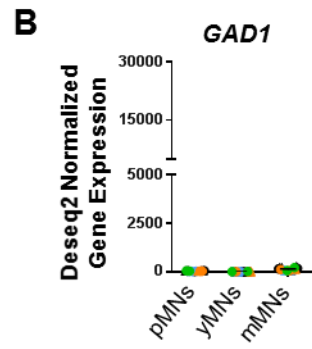
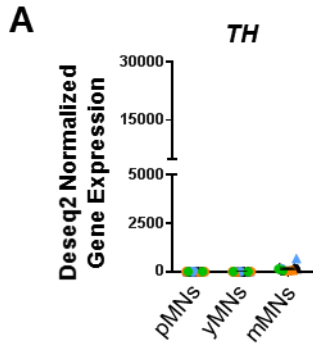
Supplementary Figure S4. Analysis of mutations in ALS patients' cells.

(A, B) DNA direct sequencing of control and patient derived-iPSC confirms the presence of (A) the N139D mutation in the SOD1 gene and (B) the G348C mutation in the TARDBP gene in patient's cells. (C). Repeat-primed PCR was used to detect expanded GGGGCC hexanucleotides. The reverse primer designed on the repeat sequence allowed the amplification of multiple fluorescent PCR products that were visualized using GeneMapper software v4.0. Profiles are shown for (1) control Ctrl69-1 fibroblasts, (2-3) fibroblasts from patient ¹C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} and ²C9ORF72^{(G4C2)ⁿ}, (4) the iPSC clone Ctrl69-2, (5-6) iPSC clones ¹C9ORF72-1 and ²C9ORF72-2, and (7) MNs from iPSC clone ¹C9ORF72-1.



Supplementary Figure S5. Deseq2 normalized gene expression of enzymes involved in neurotransmitters synthesis

(A-E) Deseq2 normalized gene expression of enzymes involved in different neurotransmitter synthesis, including Tyrosine Hydroxylase (TH), Glutamate Decarboxylase (GAD1), Glutaminase (GLS1), Dopamine β -Hydroxylase (DBH) and Tryptophan Hydroxylase (TPH). (F) List of neuron subtypes and enzymes involved in the synthesis of their respective neurotransmitters.

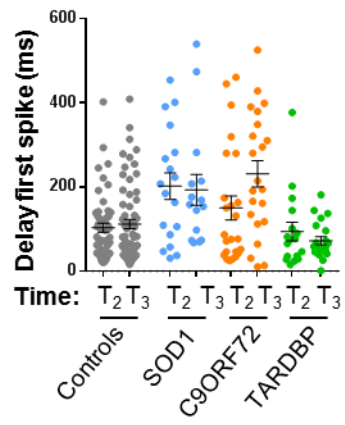
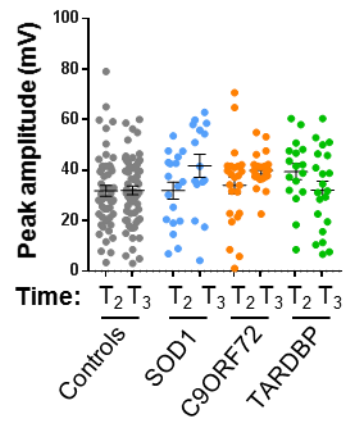
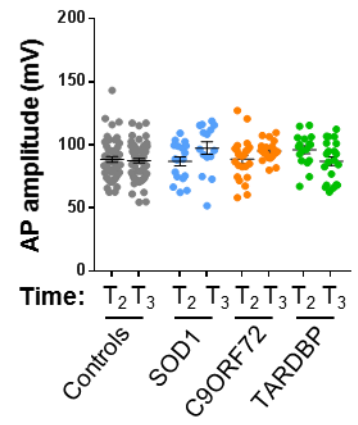


F

Enzyme	Neurone type
TH	Dopaminergic
GAD1	GABAergic
GLS1	Glutamatergic
DBH	Nordadrenergic
TPH	Serotonergic

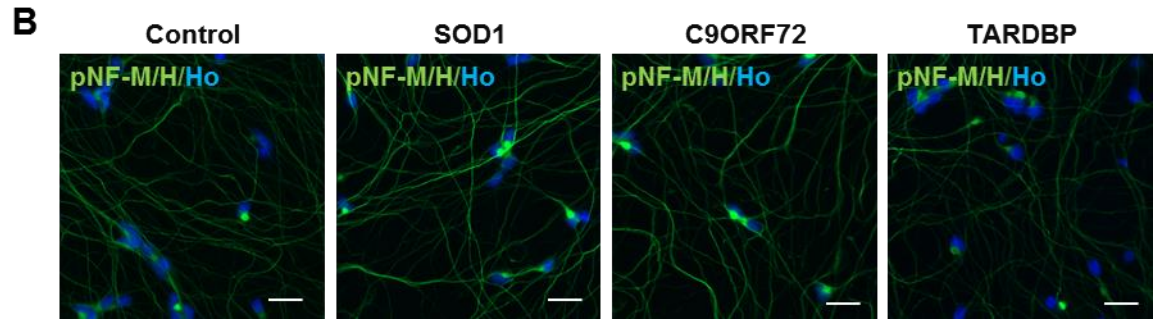
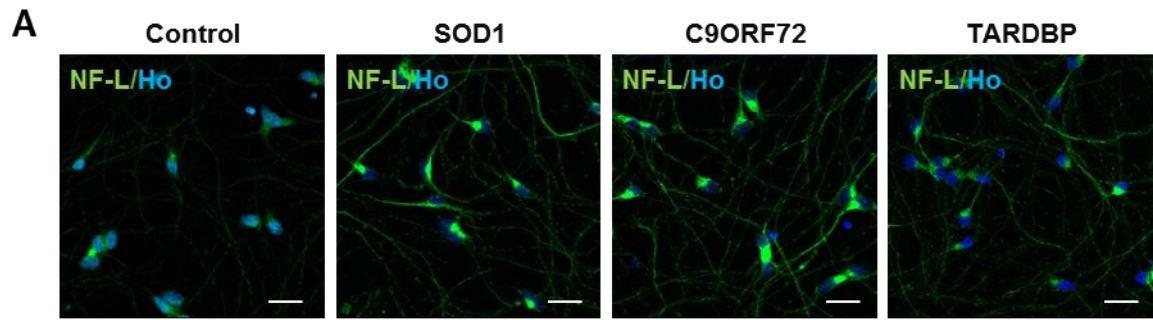
Supplementary Figure S6. Additional parameters of current-clamp recordings.

(A) Delay to the first peak. (B) Peak amplitude. (C) Action Potential (AP) amplitude. Mann-Whitney test. n=number of cells, from 3 independent experiments. Controls (Ctrl11, Ctrl69-1, Ctrl69-2) : T2, n=51; T3, n=74, patients SOD1 (SOD1-2) : T2, n=18; T3, n=15, C9ORF72 (¹C9ORF72-1) : T2, n=24; T3, n=22, TARDBP (TARDBP-1): T2, n=17; T3, n=21.

A**B****C**

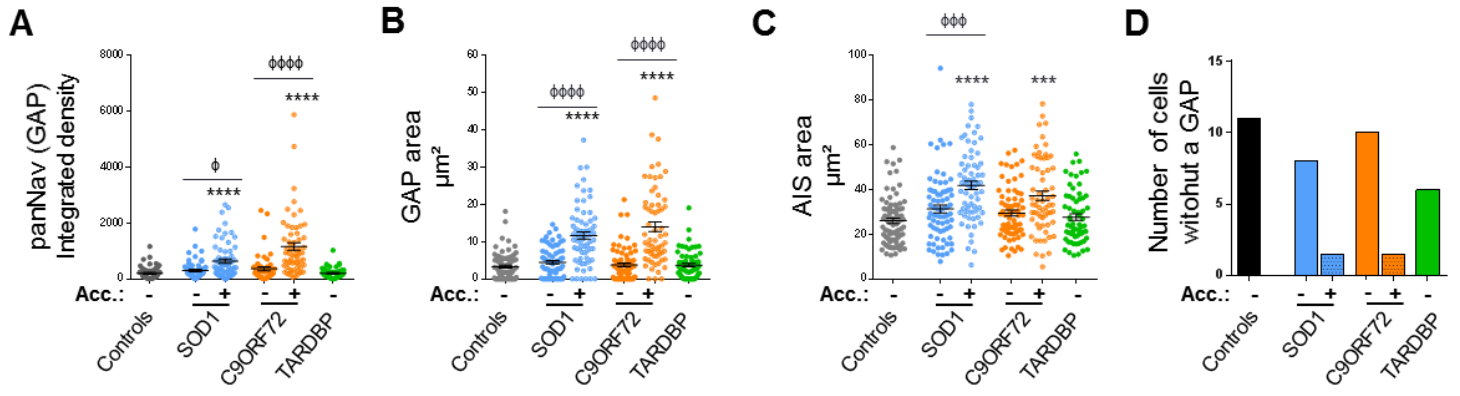
Supplementary Figure S7. Neurofilaments in ALS iPSc-derived MNs.

(A, B) Control and ALS iPSc-derived MNs were labelled at T0 with antibodies against (A) the Light neurofilament subunit NF-L or (B) the phosphorylated Medium/High neurofilament subunits pNF-M/H. Representative images show both NF-L and pNF-M/H cytoplasmic accumulations and more intense neuritic staining, especially in SOD1^{N139D} and C9ORF72^{(G4C2)ⁿ} MNs, whereas differences between control and TARDBP^{G348C} MNs are less clear. Scale bars: 10µm



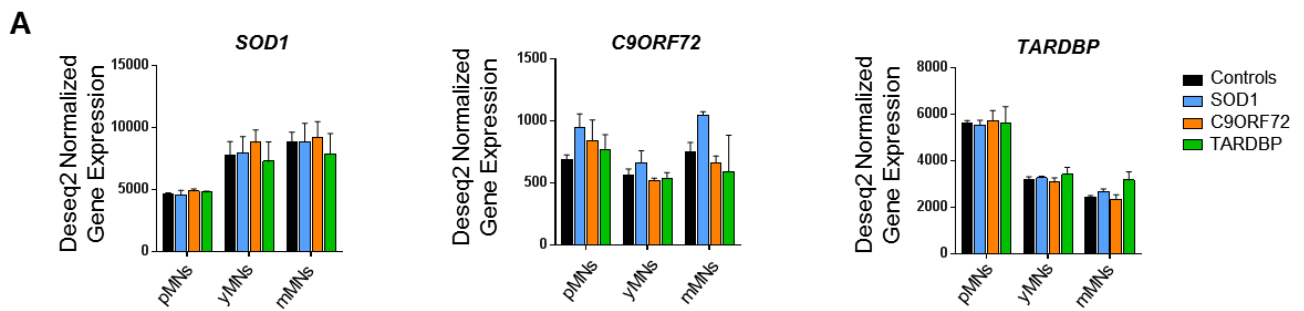
Supplementary Figure S8. Early alterations of the structural integrity of proximal axonal regions in SOD1 and C9ORF72 iPSC-derived MNs.

(A) panNav integrated density in the GAP. (B, C) GAP and AIS area. n = number of analyzed MNs from 3 independent experiments per lines. Controls (Ctrl33, Ctrl69-2): n=81. ALS without accumulation: SOD1 (SOD1-1, SOD1-2): n=74, C9ORF72 (C9ORF72-1, ²C9ORF72-2): n=71, TARDBP (TARDBP-1, TARDBP-2) n=71. ALS with accumulation: SOD1 (SOD1-1, SOD1-2): n=69, C9ORF72 (C9ORF72-1, ²C9ORF72-2): n=63. Kruskal-Wallis with Dunn's test (mean ± SEM). Statistical significance shown either between ALS and control MNs (*) or between MNs with or without accumulation (ϕ). ***p<0.001, ****/ϕϕϕp<0.0001, ϕp<0.05.



Supplementary Figure S9. RNA-seq analysis to identify early altered mechanisms in ALS MNs.

(A) Deseq2 normalized gene expression of SOD1, C9ORF72 and TARDBP, showing no major gene expression difference in mutant or control MNs. (B) Number of differentially regulated genes, upregulated or downregulated, in yMNs versus pMNs and in mMNs versus yMNs, and number of differentially regulated genes in pMNs, yMNs and MNs, in SOD1^{N139D}, C9ORF72^{(G4C2)ⁿ}, TARDBP^{G348C} or all ALS MNs versus control MNs



B

Comparisons			Total	Up	Down
Time	yMNs vs pMNs	Controls	7861	3835	4026
		ALS	8081	3919	4162
	mMNs vs yMNs	Controls	0	0	0
		ALS	2539	1704	835
Genotype	SOD1 vs Controls	pMNs	64	29	35
		yMNs	60	32	28
		mMNs	168	86	82
	C9ORF72 vs Controls	pMNs	0	0	0
		yMNs	16	4	12
		mMNs	4	4	0
	TARDBP vs Controls	pMNs	49	25	24
		yMNs	76	22	54
		mMNs	429	365	64
	ALS vs Controls	pMNs	9	7	2
		yMNs	96	25	71
		mMNs	39	29	10

Supplementary Table S1: Primary antibodies

Primary Antibodies	Isotype	Dilution	Supplier
AFP	IgG2a	1/200	Chemicon
AnkG	IgG2a	1/200	Neuromabs
CST3	Rabbit	1/50	Sigma
Islet1	Rabbit	1/100	Abcam
MAP2	IgG1	1/500	Chemicon
Nanog	Rabbit	1/100	Abcam
Nestin	Rabbit	1/500	Millipore
NF-L	Igg1	1/200	Sigma
Olig2	Rabbit	1/1000	Millipore
Pan-Nav	Rabbit	1/200	Alomone Labs
p-NFH	Igg1	1/300	Millipore
p-TDP43	IgG1	1/3000	CosmoBio
SMA	IgG2a	1/200	Chemicon
SMI-310	Igg1	1:4000	Biologend
SSEA-4	IgG3	1/100	Chemicon
TDP43	Rabbit	1/100	Proteintech
TRA1-60	IgGM	1/100	Chemicon
Tuj1	Igg2a	1/500	Covance
VACHT	Rabbit	1/1000	Synaptic System

Supplementary Table S2: Secondary Antibodies

Secondary Antibodies	Dilution	Supplier
goat anti-mouse IgG1 AlexaFluor® 488	1/2000	Molecular Probes
goat anti-mouse IgG1 AlexaFluor® 555	1/2000	Molecular Probes
goat anti-mouse IgG1 AlexaFluor® 647	1/500	Molecular Probes
goat anti-mouse IgG2a AlexaFluor® 488	1/500	Molecular Probes
goat anti-mouse IgG2a AlexaFluor® 555	1/500	Molecular Probes
goat anti-mouse IgG2a AlexaFluor® 647	1/500	Molecular Probes
goat anti-rabbit AlexaFluor® 647	1/500	Jackson ImmunoResearch
goat anti-rabbit AlexaFluor® 488	1/1000	Molecular Probes
goat anti-rabbit AlexaFluor® 555	1/1000	Molecular Probes

Supplementary Table S3: Description of ALS patients (*post-mortem* tissues)

ALS gene / mutation	Sexe	Site of onset	Age at death	Progression
SOD1^{D83G}	male	Upper limb	73	Aggressive (<1years)
C9ORF72^{(G4C2)_n}	male	Bulbar	55	Aggressive (1,6 years)
TARDBP^{G348V}	male	Upper limb	47	Aggressive (3 years)

Acknowledgements

We thank patients for their participation to the clinical assay ALSCELL, devoted to create a collection of fibroblasts of patients with ALS (collaboration between the Pasteur Institute and the Hôpital Pitié-Salpêtrière). We also thank patients and their families for *post-mortem* tissues. We also thank Dr Nathalie Sol-Foulon for helpful discussions.

We thank the following ICM core facilities: CELIS, CELIS-iPS, CELIS-Ephys, IGENSEQ, which received funding from the program “Investissements d’avenir” ANR-10-IAIHU-06. We also thank the ICM-QUANT core facility for assistance with image analysis (Aymeric Millecamps, Aurélien Dauphin, Julien Dumont), and for electronic microscopy experiments (Asha Baskaran, Dominique Langui). We thank Pierre de la Grange and Noémie Robil from GenosplICE for RNA-seq analysis. We thank François-Xavier Lejeune from ICONICS for statistical analysis. The research leading to these results has also received funding from the program “Investissements d’avenir” ANR-11-INBS-0011 - NeurATRIS: Translational Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences.

Work in the team of D. Bohl was supported by l’Agence Nationale pour la Recherche (Laboratoire d’Excellence Revive, Investissement d’Avenir; ANR-10-LABX-73), the Thierry Latran foundation, the Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres maladies du motoneurone (ARSLA), the Association Française contre les Myopathies (AFM grant), the Incentive grant from Institut Carnot (Institut Pasteur), and the association Aide à la Recherche des Maladies du Cerveau (ARMC). Cynthia Lefebvre-Omar was supported by a fellowship from Revive (ANR-10-LABX-73).

We thank the Institut Pasteur and Dr Jean Michel Heard, the head of the unit U1115, where all iPSC clones were generated. A MTA was established between IP and Inserm.

Author contributions

C.L-O: provision of study material, collection, assembly of data, data analysis, manuscript writing (all except the generation of iPSC and electrophysiological recordings)

E.L.: provision of study material, collection and assembly of data, data analysis (cell culture and molecular biology)

C.D.: collection and assembly of data, data analysis (electrophysiology)

B.L.: collection and assembly of data, data analysis (electrophysiology)

S.B.: provision of study material, collection and assembly of data (iPSC generation)

G.T.: provision of study material, collection of data (iPSC generation)

G.B.: provision of study material, collection of data (iPSC generation)

C.N.: provision of study material (fibroblasts of patient)

M. D.: conception and data analysis (AIS)

F.S.: provision of study material (fibroblasts of patients)

L.L.: provision of study material (fibroblasts of patients)

D.S.: provision of study material, collection and assembly of data, data analysis (human tissues)

C.L.: data analysis and interpretation

S.M.: data analysis and interpretation (genetic)

S. Bo.: data analysis and interpretation

D.B.: conception and design, financial support, provision of study material, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing

See also Acknowledgments for other contributions

Conflict of interest statement

Non declared

II. ARTICLE 2 (COLLABORATION) : L'INHIBITION DE HDAC6 RESTAURE LES DEFAUTS DE TRANSPORT AXONAL DES MOTONEURONES DERIVES D'INDIVIDUS MUTES AU NIVEAU DU GENE FUS

1. RESUME

En parallèle de ces travaux de thèse, nous avons travaillé en collaboration avec une équipe ayant accès à des biopsies de fibroblastes de 4 patients mutés au niveau du gène *FUS* (3 mutés R521H et 1 muté P525L). Lors de cette collaboration, nous avons non seulement transféré notre savoir-faire pour générer des MNs suivant le protocole *Maury et al.* (Maury et al., 2015) mais aussi toutes les mises au point pour réaliser des cultures comparables au niveau densité des MNs sur les lamelles et temps d'analyses. Ainsi, cela nous permet aujourd'hui de comparer nos résultats sur les MNs porteurs des mutations au niveau des gènes *SOD1*, *C9ORF72* et *TARDBP* avec des MNs issus de patients mutés au niveau du gène *FUS*.

Cette collaboration a abouti à un article publié en 2017 (Guo et al., 2017a). Sans surprise, l'article a montré que les iPSC mutées au niveau du gène *FUS* se différenciaient comme les contrôles (dont une lignée contrôle isogénique R521R) avec une pureté comprise entre 70 à 95% de MNs. A T1 (**cf. Article 1, Fig. 1**), lorsque les MNs étaient plus matures, la protéine FUS était délocalisée dans le soma et les neurites uniquement pour les MNs mutants et d'autant plus pour les lignées P525L, ce qui était en accord avec les résultats publiés dans la littérature. *Lenzi et al.* avaient en effet observé que la mutation P525L causait une délocalisation plus importante par rapport à d'autres mutations. Or, leurs résultats avaient été observés dans une lignée mutée à partir d'un contrôle, sans le fond génétique des patients. Ceci pourrait expliquer pourquoi la mutation P525L est une cause de SLA très précoce, plus agressive que la mutation R521H (**Fig. 1 p. 207**).

Comme les MNs mutants *C9ORF72*, *SOD1* et *TARDBP*, avant T1 le marquage des MNs avec NF-L ne semblait pas altéré et aucune mort cellulaire des MNs mutés au niveau du gène *FUS* n'a été observé même après une longue période de maturation.

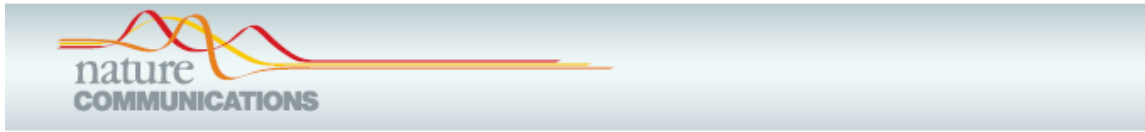
A la différence des MNs mutés *C9ORF72*, *SOD1* et *TARDBP*, les MNs *FUS* étaient moins excitables que les contrôles vers T2. Au même temps d'analyse, le ratio des densités de courants Na⁺/K⁺ était diminué suggérant que les mécanismes pathologiques des MNs mutés au niveau du gène *FUS* seraient différents des MNs mutés dans les gènes *C9ORF72*, *SOD1* ou *TARDBP* (**Fig. 2 p. 209**).

D'autre part, le transport axonal était perturbé dans les MNs mutés au niveau du gène *FUS*. Alors que le nombre et la morphologie des mitochondries étaient normaux, leur proportion mobile diminuait à partir de T1 dans les MNs *FUS*. De la même façon, le transport des vésicules de RE était aussi altéré chez les MNs mutants (**Fig. 3 p. 210**). En outre, la publication a mis en évidence la perturbation des points de contact entre la mitochondrie et le RE (Mitochondria-associated ER

membrane : MAMs), importants par exemple pour le trafic intracellulaire. Aucune anomalie de transport mitochondrial n'a été mise en évidence dans la lignée isogénique synthétisée à partir de la mutation R521H. Aussi, la surexpression de la protéine FUS dans des MNs issus de lignées embryonnaires porteuses de mutations au niveau du gène *FUS* perturbait le transport axonal, à la différence de la surexpression de la protéine contrôle dans les MNs contrôles, suggérant que le transport axonal est altéré et causé par des mutations au niveau du gène *FUS* (**Fig. 4 p. 212**).

De façon intéressante, l'inhibition chimique d'HDAC6 (par TubastatinA ou ACY-738) ou la diminution d'HDAC par des ASOs a permis de restaurer les défauts de transport axonal des mitochondries et du RE ainsi que la réduction des MAMs (**Fig. 5 p. 213**). Ces composés n'ont pas modifié la délocalisation de la protéine FUS, mais ont permis d'augmenter l'acétylation de l' α -tubuline. En conséquence, l'hypothèse proposée par nos collaborateurs est que cette acétylation augmenterait la liaison des protéines motrices aux microtubules, permettant ainsi d'augmenter le transport des mitochondries et du RE.

Sachant que nos travaux suggèrent une perturbation précoce de l'AIS qui pourrait avoir des conséquences sur le transport axonal, il sera intéressant d'analyser les effets de ces inhibiteurs d'HDAC6 sur les MNs de notre étude.



ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-00911-y

OPEN

HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients

Wenting Guo^{1,2}, Maximilian Naujock^{3,4}, Laura Fumagalli^{1,2}, Tijs Vandoorne^{1,2}, Pieter Baatsen⁵, Ruben Boon⁶, Laura Ordovás^{6,7,8}, Abdulsamie Patel⁶, Marc Welters⁶, Thomas Vanwelden⁶, Natasja Geens^{1,2}, Tine Tricot⁶, Veronick Benoy^{1,2}, Jolien Steyaert^{1,2}, Cynthia Lefebvre-Omar⁹, Werend Boesmans¹⁰, Matthew Jarpe¹¹, Jared Sternebeck¹², Florian Wegner³, Susanne Petri³, Delphine Bohl⁹, Pieter Vanden Berghe¹⁰, Wim Robberecht^{1,13}, Philip Van Damme^{1,2,13}, Catherine Verfaillie¹⁰ & Ludo Van Den Bosch^{1,2}

Amotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rapidly progressive neurodegenerative disorder due to selective loss of motor neurons (MNs). Mutations in the fused in sarcoma (*FUS*) gene can cause both juvenile and late onset ALS. We generated and characterized induced pluripotent stem cells (iPSCs) from ALS patients with different *FUS* mutations, as well as from healthy controls. Patient-derived MNs show typical cytoplasmic *FUS* pathology, hypoexcitability, as well as progressive axonal transport defects. Axonal transport defects are rescued by CRISPR/Cas9-mediated genetic correction of the *FUS* mutation in patient-derived iPSCs. Moreover, these defects are reproduced by expressing mutant *FUS* in human embryonic stem cells (hESCs), whereas knockdown of endogenous *FUS* has no effect, confirming that these pathological changes are mutant *FUS* dependent. Pharmacological inhibition as well as genetic silencing of histone deacetylase 6 (HDAC6) increase α -tubulin acetylation, endoplasmic reticulum (ER)-mitochondrial overlay, and restore the axonal transport defects in patient-derived MNs.

¹KU Leuven-Department of Neurosciences, Experimental Neurology and Leuven Institute for Neuroscience and Disease (LIND), Leuven 3000, Belgium. ²VIB, Center for Brain and Disease Research, Laboratory of Neurobiology, Leuven 3000, Belgium. ³Department of Neurology, Hannover Medical School, Hannover 30625, Germany. ⁴CNS Research Department, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach an der Riß 88400, Germany. ⁵VIB Bio Imaging Core and VIB-KU Leuven, Center for Brain and Disease Research, Leuven 3000, Belgium. ⁶KU Leuven-Stem Cell Institute (SCII), Leuven 3000, Belgium. ⁷Aragon I+D Foundation (ARAID), Zaragoza 50018, Spain. ⁸Biomedical Signal Interpretation and Computational Simulation (BSICoS) Group, Aragon Institute of Engineering Research, IIS Aragón, University of Zaragoza, Zaragoza 50018, Spain. ⁹Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris 75013, France. ¹⁰Lab for Enteric Neuroscience, TARGID, KU Leuven, Leuven 3000, Belgium. ¹¹Acetylon Pharmaceuticals Inc., Boston, MA 02210, USA. ¹²Center for Regenerative Therapies Dresden (CRTD), Technische Universität Dresden, Dresden 01069, Germany. ¹³University Hospitals Leuven, Department of Neurology, Leuven 3000, Belgium. Catherine Verfaillie and Ludo Van Den Bosch contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.V. (email: Catherine.Verfaillie@med.kuleuven.be) or to L.V.D.B. (email: Ludo.Vandenbosch@kuleuven.vib.be)

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common degenerative disorder of motor neurons (MNs) in adults and is characterized by the selective death of both upper and lower MNs. This wasting of MNs leads to progressive paralysis and death of the patient due to respiratory failure usually within 2 to 5 years after symptom onset¹. In most cases, ALS is a sporadic disease although ~10% of patients have a clear family history. Mutations in the superoxide dismutase 1 (*SOD1*), the TAR DNA-binding protein (*TARDBP*), the fused in sarcoma (*FUS*), and the chromosome 9 open reading frame 72 (*C9orf72*) genes are the most prevalent ones¹. No effective treatment is available for ALS. Riluzole, an FDA-approved drug which has anti-excitotoxic properties, prolongs life by only a few months². Although intensive basic research has been done based on different ALS animal models, none of the discovered strategies has been successfully translated into a therapy³. As a consequence, more reliable ALS models are urgently needed. MNs differentiated from patient-derived-induced pluripotent stem cells (iPSCs) provide a new opportunity to model human disease starting from patient material and avoiding effects of species differences and/or overexpression. It can mimic the developmental process in vitro, which could contribute to understand basic disease mechanisms, especially early pathological changes that are potentially amenable to drug screening⁴.

FUS was first identified as an oncogene and was reported as an ALS-causing gene in 2009^{5–7}. It contains a glycine-rich region, an RNA recognition motif and a nuclear localization signal (NLS). Many point mutations in *FUS* have been discovered since then and a large number of these are situated in the C-terminal NLS region⁸. *FUS* can also cause a rare and very aggressive juvenile onset ALS^{5,9}. *FUS* functions as a DNA/RNA-binding protein and is involved in multiple aspects of DNA/RNA metabolism⁸. The most significant pathological change in post mortem tissue is the cytoplasmic mislocalization of *FUS*. In iPSC models, cytoplasmic mislocalization of mutant *FUS* was reported by three independent groups in their patient-derived MNs^{10–12}. Cytoplasmic *FUS* aggregates were observed by Liu et al.¹⁰ for the P525L mutation. In addition, electrophysiological changes have been frequently observed in ALS patient-derived MNs^{11, 13–15}. Both hyperexcitability and hypoexcitability have been proposed as pathophysiological defects in these models^{11, 13–15}. A recent study based on iPSC-derived MNs carrying mutations in *C9orf72* or in *TARDBP* suggested a switch from hyperexcitability to hypoexcitability, which could result in MN death¹². For *FUS*, intrinsic membrane hyperexcitability was presented by Wainger et al.¹⁴, whereas hypoexcitability (characterized by reduced repetitive and spontaneous action potentials, lower synaptic activity and lower intracellular Na⁺/K⁺ ratios) was reported by Naujock et al.¹³

There is no clear explanation why MNs selectively degenerate in ALS. One hypothesis is based on the observation that MNs characterized by long axons degenerate first and that altered functions of the most distal sites occurs at initial stages of disease¹⁶. In this dying-back theory, MNs lose their function at the distal axon and retract back to the MN soma. The longest and largest axons with the highest metabolic demand seem to be the most vulnerable ones, which suggest that defects in axonal transport could be involved in this neurodegenerative process¹⁷. Most of the energy comes from mitochondria transported to the distal site where they are most needed¹⁷. In addition, multiple cargos such as proteins, mRNAs, lipids, and organelles are mostly synthesized in the cell body and are transported to the distal part of the axon to maintain their function¹⁸. About 5–20% of the mitochondria are in very close proximity to the endoplasmic reticulum (ER), which seems to have an important role in many neurodegenerative diseases, including ALS^{19, 20}. This region is called the mitochondria-associated ER membrane (MAM) and is

linked to intracellular trafficking of mitochondria and ER, Ca²⁺ and phospholipid exchange, energy metabolism, mitochondrial biogenesis, ER stress responses, and autophagy^{19, 20}. MAMs were reported to be regulated by TDP-43, which is the protein encoded by *TARDBP* and by *FUS* in transfected cells and in mouse models through activation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)^{21, 22}.

We previously discovered that histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors could rescue axonal transport defects in dorsal root ganglion (DRG) neurons from a transgenic mouse model of the axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2)²³. In contrast to the other family members of the HDAC family that mainly deacetylate histones in the nucleus, HDAC6 is localized in the cytoplasm and is the major deacetylating enzyme of α -tubulin²⁴. Acetylation of α -tubulin is important for the binding of molecular motor proteins to the microtubules^{25, 26}. The importance of HDAC6 in ALS is illustrated by the fact that genetic deletion of HDAC6 significantly slowed disease progression and prolonged survival of the mutant *SOD1*^{G93A} mouse model²⁷. *FUS* and TDP-43 have also been reported to regulate HDAC6 expression^{28–30}. As a consequence, one of our aims was to investigate the therapeutic potential of HDAC6 inhibition.

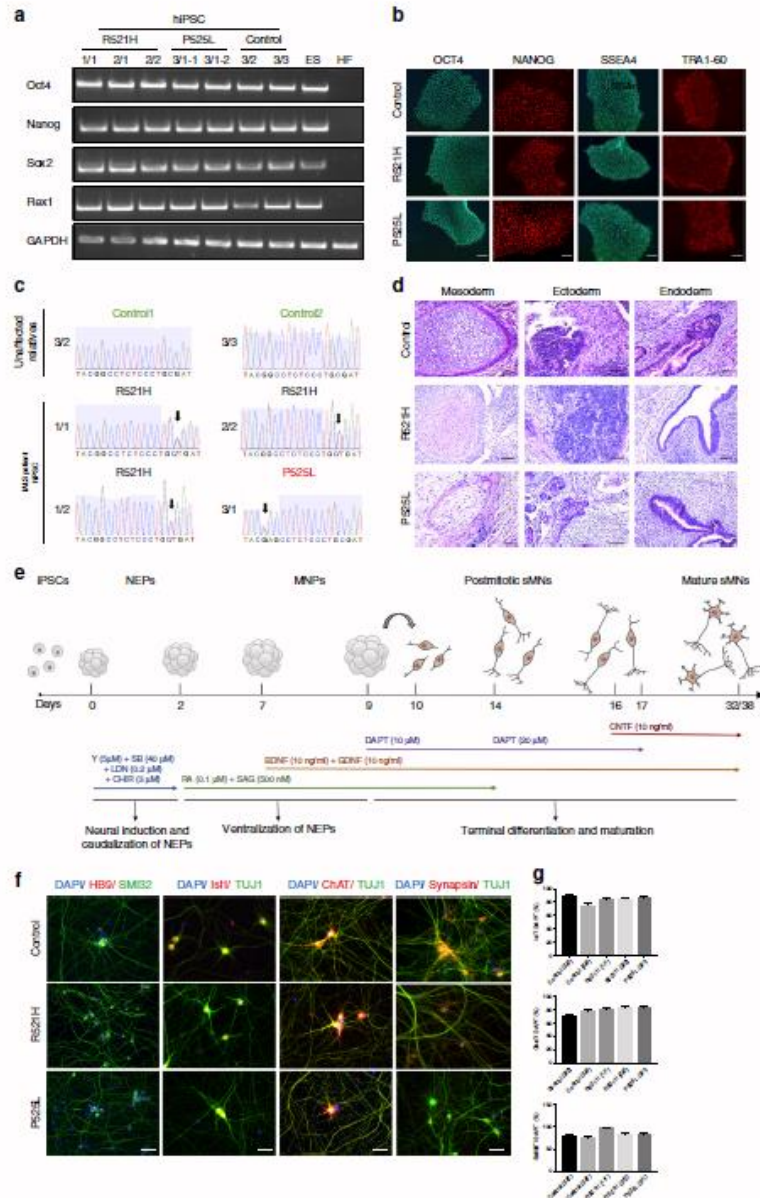
To further investigate the pathological mechanism and to identify potential therapeutic strategies, we generated iPSCs from fibroblasts of ALS patients carrying different *FUS* mutations, as well as from family members without mutations. In addition, we generated isogenic control lines using the CRISPR-Cas9 technology and overexpressed wildtype and mutant *FUS* in human embryonic stem cells (hESCs). Highly pure MN cultures were obtained by differentiating these iPSCs or hESCs. The cells expressing mutant *FUS* showed cytoplasmic accumulation of *FUS*, hypoexcitability, and axonal transport defects. We could successfully rescue the axonal transport defects by treating the MNs with HDAC6 inhibitors and by silencing HDAC6 using antisense oligonucleotides (ASOs). Our results indicate that axonal transport could have an important role in ALS pathology, and that HDAC6 inhibition could become a promising therapeutic strategy for *FUS*-induced ALS.

Results

Generation and characterization of iPSCs and MNs. To investigate the effect of mutations in *FUS* on MNs, we generated iPSCs from fibroblasts of ALS patients with *FUS* mutations and controls. Fibroblasts from four different individuals with point mutations in *FUS* were used. Three carried a heterozygous R521H mutation, whereas another one carried a heterozygous P525L mutation (Supplementary Table 1). For the P525L mutation, we generated multiple lines to exclude possible heterogeneity between different iPSC lines of the same patient. Both R521H and P525L point mutations are localized in the NLS region of the *FUS* protein. P525L is an aggressive mutation causing rare early onset ALS, and also our patient developed the disease at an early age (Supplementary Table 1)³¹. In addition, we established two control iPSC lines (healthy control1 and healthy control2) from two healthy family members of one of our patients. We also included another two published healthy controls (healthy control3 and healthy control4) for patch clamp measurements¹³. Reprogramming of fibroblasts was performed using Sendai viral vectors expressing 4 reprogramming factors (*Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, and *cMyc*). This led to an integration-free conversion of fibroblasts into iPSCs. The absence of Sendai virus was confirmed by qPCR analysis (Supplementary Fig. 1A). The reprogramming efficiency of mutant and control fibroblasts was the same. All iPSC lines expressed pluripotent stem cell markers as determined by semi-quantitative PCR for *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1* (Fig. 1a) and by immunocytochemical analysis for SSEA4, TRA1-60,

OCT4, NANOG (Fig. 1b). The pluripotency was also confirmed by the analysis of *in vivo* teratoma formation, which contained the three germ layers (Fig. 1d). All iPSC lines contained the patient-specific *FUS* mutation (Fig. 1c). Furthermore, we established one isogenic control line for the 2/2 patient with the

R521H mutation using the CRISPR-Cas9 technology. The genome-edited iPSC line retained the pluripotency markers (Supplementary Fig. 2A) and showed markers of the three germ layers after the embryonic body formation analysis (Supplementary Fig. 2B). The origin of the iPSC lines from the specific



fibroblasts was confirmed by the single nucleotide polymorphism (SNP) analysis (Supplementary Table 2).

To differentiate iPSCs into MNs, we used a slightly modified protocol originally described by Maury et al.³² (Fig. 1e). We used SMAD inhibition and Wnt activation to obtain neuroepithelial stem cells (NEPs). Subsequently, caudalization was induced by retinoic acid (RA), followed by induction of ventralization using a combination of RA, and smoothened agonist (SAG). On day 9, DAPT, a γ -secretase inhibitor, was added to enhance the conversion of spinal MN progenitors into post-mitotic spinal MNs. Immature MNs obtained at day 17 were maintained in culture with ciliary neurotrophic factor (CNTF) to allow further maturation. We found no differences in MN differentiation capability in the different mutant lines, in the isogenic genetically corrected R521H line, and in the different controls (Fig. 1f; Supplementary Fig. 2C). A high number of cells stained positive for the typical markers including HB9, Isl1, ChAT, Synapsin1, and SMI-32 (Fig. 1f). Quantification of Isl1, SMI-32, and ChAT-positive cells indicated that 70–95% of cells were positive for these MN markers, without significant differences between patients and controls (Fig. 1g). In addition, the isogenic control line was able to differentiate into MNs and expressed the MN-specific markers at a similar ratio (Supplementary Fig. 2C).

Patient-derived MNs show FUS pathology and hypoexcitability. We used immunostaining to visualize FUS localization in different cells types. In fibroblasts, nuclear clearance of FUS was observed in patient lines but not in healthy controls (Fig. 2a). This phenotype was prominent in fibroblasts carrying the P525L mutation, whereas it could only be detected in a few cells with the R521H mutation (Fig. 2a). In undifferentiated iPSCs, both P525L and R521H showed nuclear clearance of FUS with again a more pronounced mislocalization of FUS in the P525L mutant line (Fig. 2a). In mature MNs at day 38 of differentiation, both iPSC-derived MNs harboring the P525L or the R521H mutation showed obvious mislocalization of FUS to the neurites, whereas almost no FUS could be detected in the neurites of healthy controls (Fig. 2b). Once we corrected the point mutation, the cytoplasmic FUS localization was fully rescued (Supplementary Fig. 4A). Consistent with the observation in fibroblasts and in undifferentiated iPSCs, the P525L mutant lines showed a much higher amount of FUS mislocalization than the R521H mutant line. These results confirmed that there is indeed cytoplasmic mislocalization of the FUS protein in cells derived from FUS-ALS patients, and that the amount of cytosolic FUS depends on the nature of the point mutation. In addition, these data demonstrate that mislocalization of FUS is not MN specific as it is also observed in fibroblasts and in undifferentiated iPSCs.

We next performed an electrophysiological evaluation of iPSC-derived MNs during week 7 after initiation of differentiation. Both control and mutant MN cultures contained cells firing single (Supplementary Fig. 3A) or repetitive action potentials

(Supplementary Fig. 3B) during stepwise depolarization in current clamp mode. This demonstrates that functional MN maturation from patient and control iPSC lines was not different. Although the number of electrophysiologically active cells with spontaneous action potentials revealed no differences between controls and patient MNs (Fig. 2e), a significant decrease in the frequency of spontaneous action potentials (Fig. 2f), but not in the amplitude of these spontaneous action potentials (Fig. 2g), was observed in patient-derived MNs compared with the healthy controls (Fig. 2c–g). This is in line with the hypoexcitability of ALS MNs described in previous reports^{11,15}. To investigate the Na^+ and K^+ currents in iPSC-derived MNs, we used whole-cell voltage clamp mode in a series of depolarizing steps (Supplementary Fig. 3C). After normalization for their membrane surface (pA/pF), the Na^+ peaks were significantly lower in patient iPSC-derived MNs compared with the controls (Supplementary Fig. 3D, F). As the K^+ current peaks were similar (Supplementary Fig. 3E), this suggests a lower ratio of Na^+/K^+ channel currents in MNs derived from mutant FUS iPSCs, which may contribute to the decreased excitability. In addition, when we recorded spontaneous post-synaptic currents in whole-cell voltage clamp mode, the frequency of synaptic activity was significantly decreased in patient iPSC-derived MNs compared with the healthy controls (Fig. 2h, j). Similar to what we observed for the spontaneous action potentials, the proportion of active cells and the amplitudes did not show any change between patients and control (Fig. 2i, k). Interestingly, the synaptic input could be blocked by the application of a glutamatergic AMPA receptor antagonist, NBQX, and not by a GABA receptor antagonist, bicuculline (Supplementary Fig. 3G, H).

Progressive axonal transport defects in patient-derived MNs. Disturbances in axonal transport are considered as an early event in the pathogenesis of ALS¹⁷. Therefore, we measured mitochondrial transport in iPSC-derived mature MN cultures in both patient and control cell lines by using MitoTracker to label mitochondria in a live cell imaging setup. Kymographs were used to quantify the total number of moving as well as stationary mitochondria. In these kymographs, stationary mitochondria are shown as vertical lines and diagonal lines represent moving ones (Fig. 3a).

Although the total number of mitochondria was not different between patient and control MNs at 6 to 7 weeks after initiation of differentiation (Fig. 3b), patient-derived MNs showed a significant decrease in the number of moving mitochondria (Fig. 3c). There was no significant difference between the different patient lines. When we measured mitochondrial transport at different times after plating, a progressive mitochondrial transport defect was observed in patient-derived MNs with a normal number of moving mitochondria at 2 weeks of differentiation and a significantly reduced number of moving mitochondria starting from the third week, which became worse over time (Fig. 3e).

Fig. 1 Generation and characterization of iPSCs and MNs from ALS patients and controls. **a** Semi-quantitative PCR of Oct4, Nanog, Sox2, and Rex1 in patient iPSCs, control iPSCs, human ESC (ES), and human fibroblasts (HF). **b** Immunocytochemical characterization of iPSCs for the pluripotency markers Tra1-60, SSEA4, Oct-4, and Nanog from 2/2, 3/1-2, and 3/2 lines. Scale bar = 50 μm . **c** Sequencing confirming the heterozygous R521H and P525L FUS mutations in patient-derived iPSCs and the absence of FUS mutations in the control iPSC lines. **d** Hematoxylin-eosin staining identifying three germ layers in teratomas formed after iPSC injections in immunodeficient mice. Neural-like tissues represent ectoderm, cartilage represents mesoderm, and gut epithelium represents endoderm. **e** Schematic protocol of motor neuron differentiation. Y Y-27632, SB SB 431542, LDN LDN-193189, CHIR CHIR99021, RA retinoic acid, SAG smoothened agonist, DAPT a γ -secretase inhibitor, NEPs neuroepithelial stem cells, MNPs motor neuron progenitors, sMNs spinal motor neurons, BDNF brain-derived neurotrophic factor, GDNF glial cell line-derived neurotrophic factor, CNTF, ciliary neurotrophic factor. **f** Staining of different motor neuron markers (Hb9, Isl1, ChAT, SMI-32, Synapsin1), and DAPI in mutant FUS expressing and control cells at day 38. Scale bar = 50 μm . **g** Quantification of Isl1-positive (upper panel), ChAT-positive (middle panel), and SMI-32-positive (lower panel) cells expressed relative to the total number of DAPI-labeled cells. $N = 10$ images per line. Data are represented as mean \pm SEM

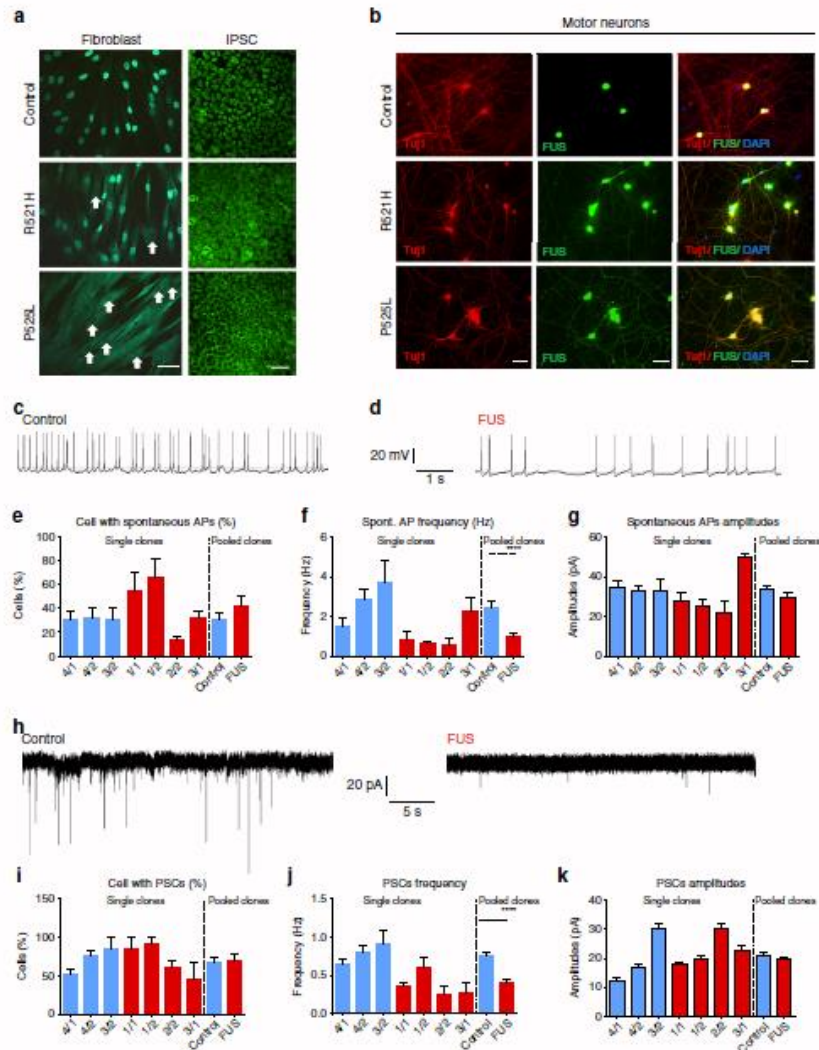


Fig. 2 ALS patient-derived MNs exhibit cytoplasmic FUS localization and hypoexcitability. **a** Immunostaining of FUS in fibroblasts and iPSCs from ALS patients and healthy controls. Nuclear clearance of FUS was observed in patient fibroblasts. White arrows highlight the nuclear clearance in patient fibroblasts carrying the R521H or P525L mutation. Scale bar = 70 μ m. **b** Immunostaining of FUS and TuJ1 with DAPI in motor neurons derived from iPSCs of ALS patients and healthy controls at the fourth week of differentiation. Scale bar = 70 μ m. **c, d** Representative traces of spontaneously occurring action potentials (APs) in healthy control and FUS iPSC-derived MNs during the seventh week of differentiation. **e–g** Characterization of MNs differentiated from iPSCs with spontaneous APs. The relative number of cells (**e** $n = 110$ and $n = 67$ for control and patients, respectively), the frequency of spontaneous APs (**f**, $n = 48$ and $n = 34$ for control and patients, respectively, Mann–Whitney test, **** P value is 0.0001) and the amplitude (**g** $n = 47$ and $n = 54$ for control and patients, respectively) were measured. Data values represent mean \pm SEM. **h** Representative traces of spontaneous postsynaptic currents (PSCs) in healthy control and FUS iPSC-derived MNs with typical MN appearance during the seventh week of differentiation. **i–k** Quantification of the relative number of cells with PSCs (**i** $n = 110$ and $n = 67$ for control and patients, respectively), the PSC frequency (**j** $n = 91$ and $n = 57$ for control and patients, respectively, Mann–Whitney test, **** P value is 0.0001) and the PSC (**k** $n = 91$ and $n = 57$ for control and patients, respectively) amplitude in iPSCs-derived motor neurons from ALS patients and healthy controls.

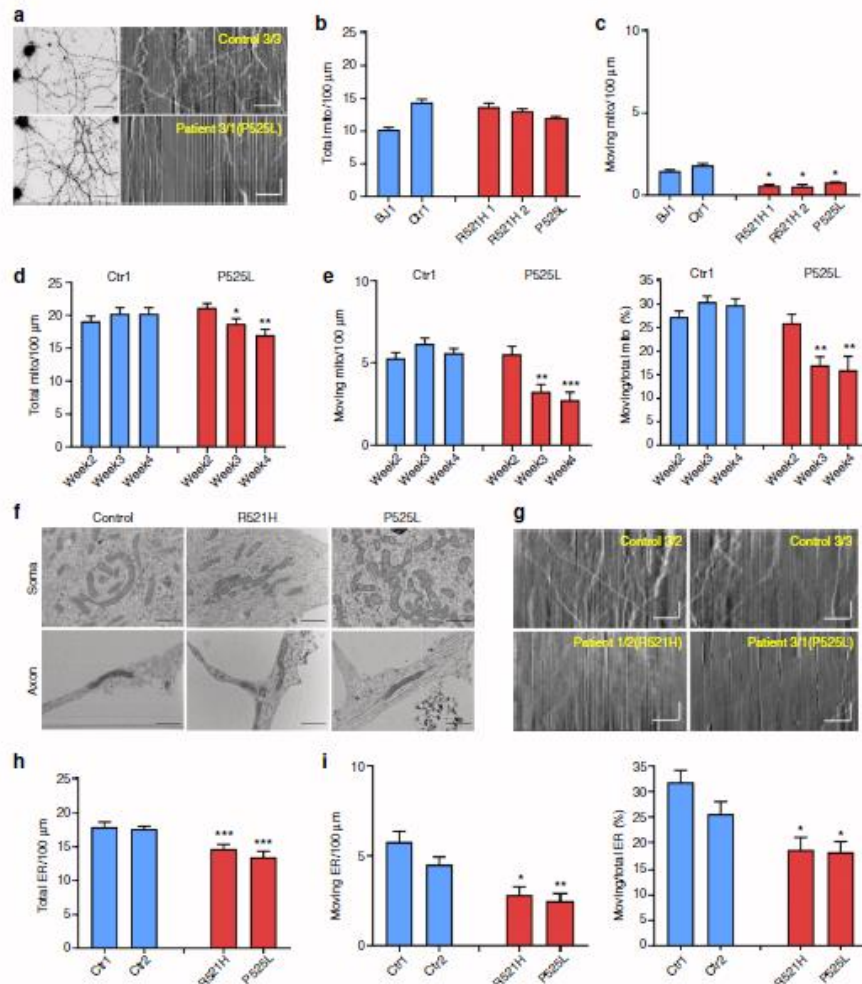


Fig. 3 Progressive axonal transport defects in ALS patient-derived MNs. **a** Representative fluorescent micrograph from control and FUS-ALS patient-derived MNs loaded with MitoTracker-Red (left) and typical kymographs (control 3/3; patient 3/1) obtained from MNs (right). Stationary mitochondria are visible as straight vertical lines, while moving mitochondria are deflected as tilted lines. Scale bar time (vertical): 35 s; scale bar distance (horizontal): 25 μ m. **b** Quantification of the number of stationary mitochondria normalized to a neurite length of 100 μ m during 200 s for MNs derived from different iPSC lines at sixth to seventh week after starting MN differentiation ($n = 5$). Data values represent mean \pm SEM. **c** Quantification of the number of moving mitochondria for MNs derived from different iPSC lines. **d** Quantification of stationary mitochondria for motor neurons derived from a patient with a P525L mutation and a control iPSC line as a function of time after plating (2 weeks, 3 weeks, 4 weeks after plating, $n = 13$ and $n = 14$ for patient and control, respectively). Data values represent mean \pm SEM. **e** Quantification of moving mitochondria and ratio of moving to total mitochondria for motor neurons derived from a patient line (3/1) with a P525L mutation and a control iPSC line (3/2). **f** EM analysis of control (3/2) and patient (R521H 2/2; P525L 3/1)-derived motor neurons at the fourth week after plating. Images of both soma and neurites are shown. Representative images from three independent experiments are presented. Scale bar = 100 nm. **g** Typical kymographs (control 1: 3/2; control 2: 3/3; R521H 1/2; P525L 3/1) obtained from motor neurons loaded with ER Tracker-Red. Scale bar time (vertical): 35 s; scale bar distance (horizontal): 25 μ m. **h** Quantification of stationary ER vesicles from MNs derived from patients with P525L or R521H mutations and control iPSC lines at the fourth week after plating ($n = 10$, $n = 11$, $n = 12$, $n = 11$ for Ctrl1, Ctrl2, R521H, and P525L, respectively). Data values represent mean \pm SEM. **i** Quantification of moving ER vesicles and ratio of moving to total ER vesicles for MNs derived from patients with P525L or R521H mutations and control iPSC lines (data are plotted as mean \pm SEM; one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test, *, **, *** P values of 0.05, 0.01, and 0.001, respectively). Data values represent mean \pm SEM.

Although the total number of mitochondria showed a slight decrease over time (Fig. 3d), the number of moving mitochondria relative to the total number remained significantly lower in MNs derived from patient iPSCs compared with the controls (Fig. 3e). As mitochondrial transport defects were previously correlated with severe mitochondrial damage in a SOD1^{A4V} iPSC model³³, we used electron microscopy (EM) to assess for the integrity of the mitochondria. However, we could not detect any obvious morphological changes in the mitochondria in the soma or axons of patient-derived MNs (Fig. 3f).

We also measured axonal transport of endoplasmic reticulum (ER) vesicles using ER-tracker (Fig. 3g–i). Patient-derived MNs also showed a significant reduction of moving ER vesicles along the axons compared with MNs from healthy control iPSC lines (Fig. 3i). However, the total number of ER vesicles in axons from MNs of patient iPSC lines was significantly reduced compared with those from controls (Fig. 3h). The fact that the percentage of moving ER vesicles relative to the total number of ER vesicles was decreased in patient lines (Fig. 3i) shows that ER vesicle transport was also decreased, similar to what was observed for mitochondrial transport. Altogether, our data indicate that axonal transport in general is progressively impaired over time in FUS-ALS patient-derived MNs.

Defects in axonal transport are caused by mutant FUS. To confirm that the observed phenotypes were due to the mutation in FUS and to eliminate possible effects of the genetic background on these phenotypes, we established an isogenic control iPSC line for one of the patient-derived iPSC lines carrying the R521H mutation using the CRISPR-Cas9 technology. Sequencing confirmed that the point mutation was corrected (Fig. 4a). As indicated before, differentiation into MNs of this genetically corrected iPSC line was similar as for the parent line. We performed mitochondrial transport experiments to assess whether the correction of the FUS mutation also corrected the defects observed in MNs derived from the parent iPSC line. We found no reduction in the total number of mitochondria, nor in the number of moving mitochondria in MNs from the genetically corrected R521R iPSC line compared with iPSC-derived MNs from controls (Fig. 4b). Thus, the axonal transport defect appears to be directly linked to the mutation in FUS. In addition, a similar rescue also happened to the cytoplasmic FUS localization (Supplementary Fig. 4A).

To further confirm the causative relationship between mutations in FUS and the axonal transport deficits, we established three FUS overexpression H9-hESC lines by inserting a single copy of the coding region of wildtype FUS, FUS with the R521H mutation and FUS with the P525L mutation, containing an FRT-flanked Hyg/TK cassette, into the AAVS1 locus^{34, 35} via recombinase-mediated cassette exchange (Fig. 4c). We confirmed the absence or presence of the different mutations by sequencing (Fig. 4d). As the construct used contains a Tet-On system, it is possible to turn on the expression of FUS by adding doxycycline. In this way, possible effects of (mutant) FUS expression during the early stages of MN differentiation are circumvented. We added doxycycline from day 17 of MN differentiation and assessed FUS pathology and axonal transport on day 38. qRT-PCR showed an approximately threefold increase in FUS mRNA levels and this increase was only found after adding doxycycline (Supplementary Fig. 4B). The induction of FUS from the transgene inserted into the AAVS1 locus was confirmed by qRT-PCR using primers in the 3xflag region of the FUS mRNA (Supplementary Fig. 4B). Overexpression of wildtype FUS and mutant FUS did not change the differentiation capability from early post mitotic MNs to mature MNs (Supplementary

Fig. 5A, B). However, a significant reduction in the number of moving mitochondria was observed after overexpression of mutant FUS, whereas wildtype FUS overexpression did not affect axonal transport (Fig. 4g). A similar situation was also observed for the cytoplasmic FUS localization (Supplementary Fig. 4C). Only if we overexpressed mutant FUS, cytoplasmic FUS was observed and the P525L mutation was always worse than the R521H mutation (Supplementary Fig. 4C). We did not observe any defect in axonal transport in control-derived MNs after knocking down FUS by using ASOs (Fig. 4c, d). All together, these overexpression and knockdown data strongly suggest that the axonal transport defects are due to mutant FUS expression through a gain-of-function mechanism.

HDAC6 inhibitors rescue axonal transport defects. We next performed studies to investigate the possible mechanism(s) responsible for the axonal transport defects in the iPSC-derived MNs-containing mutant FUS. As indicated before, we first assessed the mitochondrial integrity in mutant FUS and control-derived MNs by using EM. We could not identify abnormal mitochondrial morphology in the FUS mutant MNs (Fig. 3g). In addition, we did not observe any change in neurofilament light chain (NFL) expression in patient-derived MNs at the fourth week of differentiation (Supplementary Fig. 6). As both mitochondrial and ER vesicle transport showed defects in mutant FUS MNs, we wondered whether the mitochondria-associated ER membranes (MAMs) could be affected¹⁹. Therefore, we stained both for mitochondria and ER, and quantified the percentage of overlap of both signals. ER was labeled with protein disulfide isomerase (PDI), whereas mitochondria were labeled using translocase of the outer mitochondrial membrane protein-20 (TOM20). Pearson's correlation coefficient was used for the analysis. ALS patient-derived MNs all showed a significantly decreased overlap of ER and mitochondrial staining especially in neurites (Fig. 5a, b). MAMs also influence phospholipid metabolism. Phosphatidylcholine (PC) is the most common lipid in the cell and most enriched in the ER^{19, 36}. Cells with defective MAMs have a lower rate of phosphatidylserine (PS) conversion to PC than wildtype cells³⁷. Therefore, production of PC can be used to assess MAM disturbances. We harvested culture medium at different time points during the *in vitro* differentiation process (second, third, and fourth week after plating) and measured the level of released PC. We observed a reduction of PC in mutant FUS MNs (Supplementary Fig. 7, Fig. 5c) at the fourth week after plating. Consistent with the progressive defects found in axonal transport (Fig. 3e), PC release decreased with prolonged time in culture (Supplementary Fig. 7).

HDAC6, a class IIb histone deacetylase, is the major enzyme with α -tubulin deacetylation activity²³. In a previous study, we discovered that HDAC6 inhibitors restore mitochondrial axonal transport defects in DRG neurons from a CMT disease mouse model, which correlated with increased α -tubulin acetylation²³. In this study, we assessed the acetylation level of α -tubulin in MNs differentiated from a mutant FUS line and its isogenic control. Using western blot analysis, we detected a slight decrease of acetylated α -tubulin in patient-derived MNs compared with the isogenic control (Fig. 6d). Moreover, ER-sliding dynamics and MAM occur on acetylated microtubules³⁸. Therefore, we investigated the effect of HDAC6 inhibition on MAMs and on ER vesicle and mitochondrial axonal transport.

First, we used Tubastatin A, which is a highly selective inhibitor of the deacetylase function of HDAC6, to treat both patient and healthy control iPSC-derived MNs³⁹. The next day, cells were fixed for immunostaining or loaded with MitoTracker and ER-Tracker to measure axonal transport. On the basis of the

staining results of Tom20 and PDI, the colocalization of ER and mitochondria was significantly increased along axons in patient-derived MNs after treatment with Tubastatin A (Supplementary Fig. 9A). This indicates that MAMs were increased. In addition,

the number of moving mitochondria along the axons was restored in the patient-derived MNs (Supplementary Fig. 9B). Similarly, both total number and number of moving ER vesicles were also increased to the same level as in healthy controls

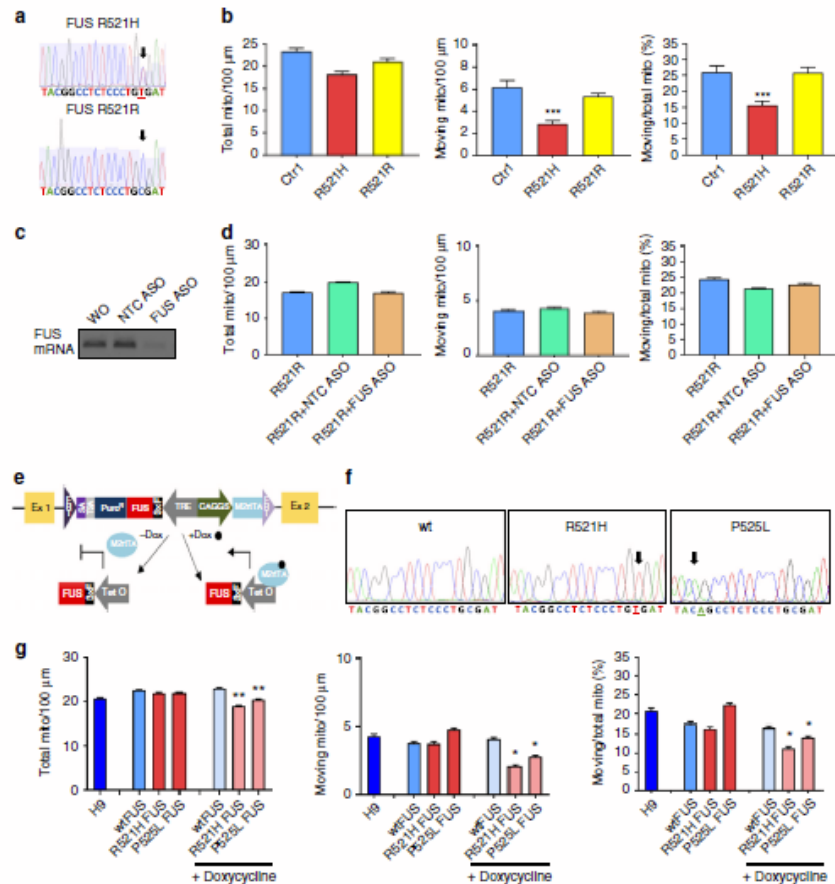
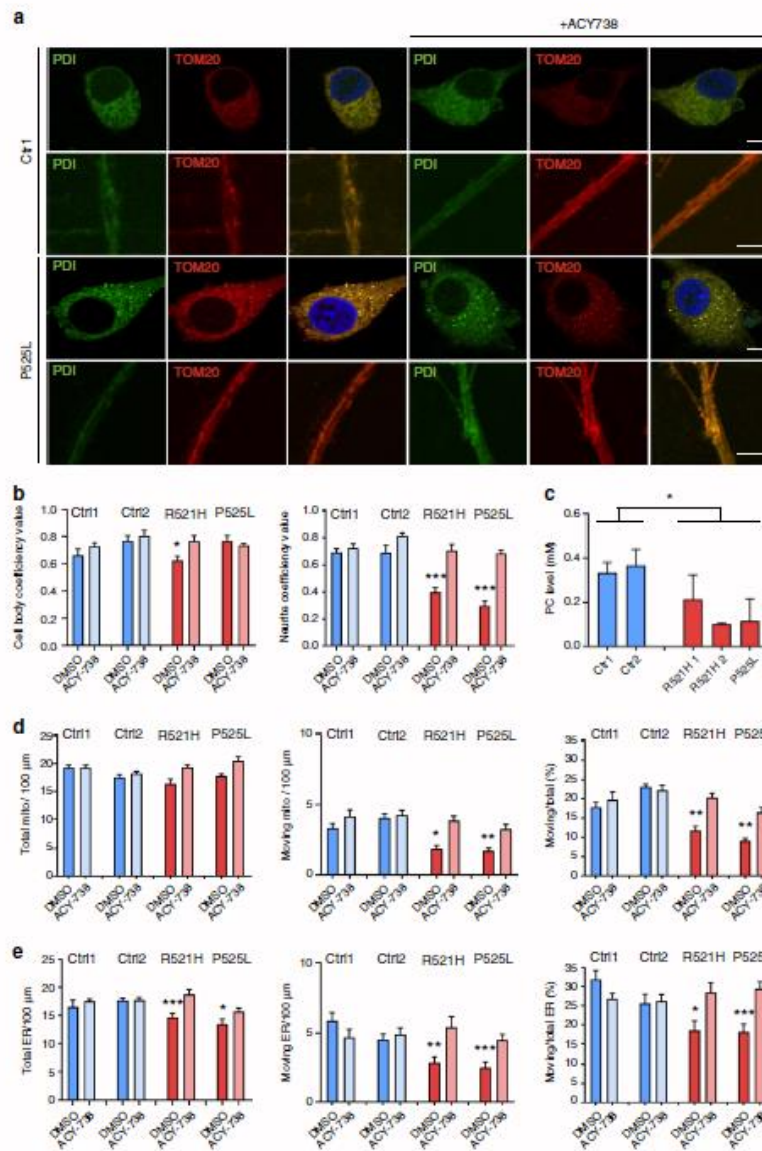


Fig. 4 Axonal transport defects are caused by mutant FUS. **a** Genomic DNA sequencing showing the nucleotide change (C to T) in the R521H patient line (labeled as FUS R521H) and the homozygous nucleotide C in the corrected isogenic control iPSC line (labeled as FUS R521R). **b** Quantifications of total mitochondria, moving mitochondria, and ratio between moving to total mitochondria normalized to a neurite length of 100 μ m during 200 s in motor neurons derived from a control iPSC line, from a patient iPSC line with the R521H mutation and its isogenic control measured at 4 weeks after plating. ($n = 11$, $n = 14$, $n = 12$, respectively, for wildtype, mutant, and isogenic control, mean \pm SEM; one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test). **c** RT-PCR validation of ASO knockdown of FUS in motor neurons. **d** Knockdown of FUS did not interfere with total number of mitochondria, moving mitochondria, and mitochondrial transport efficiency. Scrambled ASO was used as a negative control (NTC ASO). $n = 20$, $n = 19$, $n = 17$ for R521R, R521R + NTC ASO, R521R + FUS ASO, respectively. Data values represent mean \pm SEM. **e** Schematic diagram of the strategy used for inducible expression of FUS in the AAVS7 site using recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) and the targeting vector pZ : F3-P TetOn-3 \times F-FUS-F flanked by short flippase recognition targets (FRTs) in the engineered H9-hESC line. This vector also contains a Tet-On system. Adding doxycycline (Dox) to the medium results in its binding to the M2 tetracycline transactivator (M2rtTA) protein. This Dox-M2rtTA complex is capable of binding the Tet operator (TetO), which is part of the tetracycline response element (TRE), to trigger FUS expression. **f** DNA sequencing showing homozygous wildtype FUS, mutant FUS carrying the R521H or the P525L mutation in the hESC lines that can overexpress FUS. **g** Calculations of stationary mitochondria, moving mitochondria, ratio of moving to total mitochondria per 100 μ m neurite length during 200 s for motor neurons derived from hESCs at the fourth week after plating. Only overexpression of mutant FUS induces mitochondrial transport defects ($n = 12$, $n = 15$, $n = 12$, $n = 13$, $n = 14$, $n = 11$, $n = 14$, respectively, for H9, wtFUS, R521H FUS, P525L FUS, wtFUS + Dox, R521H FUS + Dox, P525L FUS + Dox, mean \pm SEM, one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test, *, **, ***P values of 0.05, 0.01, and 0.001, respectively)

(Supplementary Fig. 9C). Tubastatin A had no effect on MNs derived from healthy controls (Supplementary Fig. 9).

To confirm the Tubastatin A effect, we also tested ACY-738, which is another newly developed HDAC6 inhibitor with a higher blood–brain–barrier permeability⁴⁰. We treated the cells overnight and a similar rescue was observed in patient-derived MNs carrying different FUS mutations, whereas there was again no

effect observed in controls (Fig. 5). The overlap between ER and mitochondrial markers increased 1.5-folds in axons (Fig. 5a, b). The percentage of moving axonal mitochondria and ER vesicles in the patient cells also reversed to levels seen in the controls (Fig. 5d, e). Consistently, a slight increase in the PC level was observed in medium of patient-derived MNs after treatment with the HDAC6 inhibitors. These compounds did not change the



cytoplasmic FUS mislocalization in patient cells (Supplementary Fig. 8). To confirm the specificity of these HDAC6 inhibitors, we used an ASO to knockdown HDAC6 with 50% in our MNs by treating the MNs for 1 week with the ASO (Fig. 6a, b). Again, an increase of axonal transport in patient-derived MNs was observed. Similar as for the HDAC6 inhibitors, no effects were observed on MNs derived from the isogenic control (Fig. 6c).

Lastly, we investigated the effect of both Tubastatin A and ACY-738 on the acetylation of α -tubulin using western blot. An overnight treatment of our iPSC-derived MNs with both drugs markedly increased the acetylation of tubulin, both in the patient lines as well as in the isogenic control (Fig. 6d; Supplementary Fig. 10). In line with what we described before²³, there seems to be a good correlation between the increase in the acetylation level of α -tubulin and the rescue of axonal transport defects.

Discussion

In this study, we established iPSCs from fibroblasts of four ALS patients harboring two different point mutations (R521H and P525L) in the NLS region of FUS, as well as from two healthy controls. Furthermore, we used CRISPR-Cas9 technology to correct the point mutation in one of the ALS patient-derived iPSC lines as an isogenic control line, and we overexpressed wildtype and mutant FUS in hESCs. In this way, we investigated the causative relationship between FUS mutations and the observed defects in MNs derived from these iPSCs/hESCs. In addition, we developed a highly efficient MN differentiation protocol, which generated more than 80% of cells with MN morphology, expressing typical MN markers and exhibiting typical electrophysiological characteristics. The MNs derived from these iPSCs of ALS patients exhibited typical FUS mislocalization and hypoexcitability. In addition, progressive mitochondrial and ER vesicle transport defects developed in these iPSC-derived MNs. These axonal transport defects as well as the MAM reduction could be rescued by HDAC6 inhibition and by genetic knock-down of HDAC6 using ASOs.

Consistent with previous reports using iPSC models or post-mortem patient tissue^{6, 7, 10–12}, we observed cytoplasmic FUS mislocalization in patient cells including fibroblasts, iPSCs, and MNs. The degree of cytoplasmic mislocalization of FUS was correlated before with the mutation type and was associated with the severity of the clinical presentation and the age of disease onset⁸. This indicates that cytoplasmic FUS localization is a very early pathological change, which occurs in different cell types and of which the severity depends on the type of FUS mutation. Unlike other studies, we did not observe FUS aggregates in our mutant lines⁴¹. As aggregates were reported to colocalize with

stress-granule markers, we may not have detected FUS aggregates because we did not apply extra stress to the MNs⁴². It has been suggested that the mislocalization of FUS serves as a first hit in the pathophysiological cascade that makes the cell more vulnerable⁸. A second hit, such as cellular stress and/or defects in protein degradation, is proposed to assemble cytoplasmic FUS into stress granules and could trigger neurodegeneration⁶.

Several studies demonstrated a number of physiological changes in different iPSC-derived ALS models. Kiskinis et al.³³ reported hyperexcitability in iPSC-derived MNs carrying *SOD1*, *C9orf72*, and *FUS* mutations based on increased spontaneous firing and reduced delayed rectifier K^+ currents by multielectrode array recordings. Devlin et al.¹⁵ proposed a switch from hyperexcitability to hypoexcitability of MNs, which was dependent on the differentiation time of human iPSCs obtained from patients harboring *TARDBP* or *C9orf72* ALS mutations. Recently, Naujock et al.¹³ showed hypoexcitability in MNs derived from mutant *SOD1* and *FUS* iPSCs differentiated for 7 weeks. Although the possible change from hyperexcitability to hypoexcitability was evaluated, only increased synaptic activity but not enhanced AP firing frequencies was found in cells differentiated in culture for 3–4 weeks. The hypoexcitability was confirmed in our study as patient-derived MNs presented with a reduced frequency of APs and postsynaptic currents at week 7 of differentiation. Hypoexcitability could be a late phenotype, which can eventually cause cell death. However, we did not observe obvious cell death in the MNs derived from patient iPSCs. As a consequence, we consider the hypoexcitability as an early pathological change rather than a direct cause of cell death.

In addition, we identified axonal transport defects in MNs derived of mutant FUS iPSCs. Axonal transport abnormalities have also been reported in several animal models of ALS, especially in *SOD1* models^{17, 43, 44}. *SOD1* mutations can affect neurofilaments, mitochondria, and vesicle transport⁴⁴. Only one study based on an ALS iPSC-based model has previously identified mitochondrial transport defects in MNs derived from ALS patients carrying an A4V mutation in *SOD1*³³. In that study, mitochondrial damage was observed based on EM and it was hypothesized to be the cause of the mitochondrial transport defects³³. In the current study, we did not observe obvious structural changes in the mitochondria of mutant FUS MNs. In addition, ER vesicle transport along the axons was also decreased indicating that the disturbance in axonal transport was a more general problem. These axonal transport defects developed as a function of time in culture. They were significant at the third week after plating and became progressively worse when cells were maintained in culture. Defective axonal transport defects were also observed as a common phenotype in *Drosophila* models

Fig. 5 Restoration of axonal transport and of ER-mitochondrial overlay by HDAC6 inhibition. **a** Immunostaining for ER (using mouse PDI antibody) and mitochondria (using rabbit TOM-20 antibody) of motor neurons derived from iPSC from patients carrying the P525L mutation and healthy controls before and after an overnight treatment with ACY-738 (1 μ M). The separate views show co-localized pixels in the cell body and neurites. Scale bar = 5 μ m. **b** Quantification of the proportion of ER-merged regions and mitochondrial-merged regions relative to the total mitochondrial staining. Data were analyzed by determining the Pearson's correlation coefficient using ImageJ ($n = 20$, mean \pm SEM, one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test, *, ***P values of 0.05 and 0.001). **c** Phosphatidylcholine (PC) level in culture media from motor neuron. Media were taken for ELISA after 2 days on the culture at the fourth week after the start of differentiation. A decrease was observed in patient-derived motor neurons. Representative experiment is shown (mean of technical duplicates \pm SD). **d** Quantification of stationary mitochondria, moving mitochondria, and ratio between moving to total mitochondria normalized to a neurite length of 100 μ m in motor neurons derived from patient and healthy control iPSC lines at the fourth week after plating with or without an overnight treatment with ACY-738 ($n = 18$, $n = 16$, $n = 15$, $n = 18$, $n = 15$, $n = 13$, $n = 17$, $n = 13$ for Ctrl1 + DMSO, Ctrl1 + ACY-738, Ctrl2 + DMSO, Ctrl2 + ACY-738, R521H + DMSO, R521H + ACY-738, P525L + DMSO, P525L + ACY-738, respectively, mean \pm SEM, one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test; *, **P values of 0.05 and 0.01, respectively). **e** Quantification of stationary ER vesicles, moving ER vesicles, and ratio between moving to total vesicles normalized to a neurite length of 100 μ m in motor neurons derived from patient and healthy control iPSC lines at the fourth week after plating with or without an overnight treatment with ACY-738 ($n = 10$, $n = 19$, $n = 11$, $n = 18$, $n = 12$, $n = 11$, $n = 16$ for Ctrl1 + DMSO, Ctrl1 + ACY-738, Ctrl2 + DMSO, Ctrl2 + ACY-738, R521H + DMSO, R521H + ACY-738, P525L + DMSO, P525L + ACY-738, respectively, mean \pm SEM, one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test; *, **, ***P values of 0.05, 0.01, and 0.001, respectively)

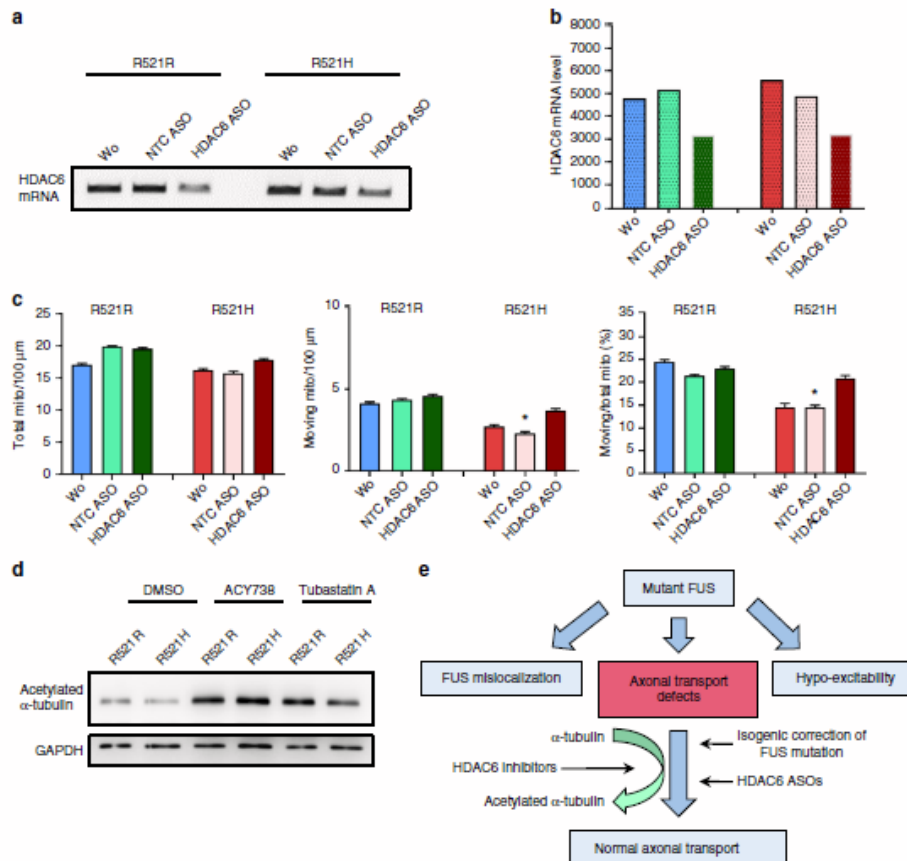


Fig. 6 Effect of genetic HDAC6 knockdown and increased acetylation levels of α -tubulin by HDAC6 inhibition. **a** RT-PCR validation of knockdown by an antisense oligonucleotide (ASO) against HDAC6 in MNs. **b** Quantification of the RT-PCR results of the gel shown in **a** illustrating the HDAC6 knockdown by the ASO. **c** Knockdown of HDAC6 using an ASO in patient-derived MNs increased axonal transport based on tracking mitochondrial movement (total number, moving number, and ratio between total and moving mitochondria). Scrambled ASO was used as a negative control (NTC ASO). $n = 20$, $n = 19$, $n = 18$, $n = 10$, $n = 11$, $n = 10$ for R521R, R521R + NTC ASO, R521R + HDAC6 ASO, R521H, R521H + NTC ASO, R521H + HDAC6 ASO, respectively; ANOVA with post-hoc Tukey's test, * P value of 0.05. **d** Western blot from MNs (R521H mutant line 2/2 and isogenic control R521R), with and without treatment with ACY-738 or Tubastatin A at day 31 of differentiation. The blot was probed with antibodies directed to acetylated α -tubulin, and GAPDH. **e** Schematic representation of our results indicating that HDAC6 inhibition rescues axonal transport defects in FUS-iPSC-derived motor neurons through increasing acetylation levels of α -tubulin

of *TARDBP*, *FUS*, and *C9orf72*¹⁷. These axonal transport deficits are considered as an early pathological change during the development of ALS, which might cause dysfunction of the neuromuscular junctions, which highly rely on energy supplied by mitochondria and on efficient synaptic cargo delivery to control proper muscle contraction⁴⁵. If axonal transport is hampered in MNs, this leads to the loss of neuromuscular junctions, axon degeneration, and finally death of the soma. This sequence of events has led to the concept of a dying back mechanism in ALS¹⁶. As axonal transport defects were rescued in the isogenic genetically corrected R521R iPSC-derived MNs, the mutation itself is sufficient to induce this phenotype. Moreover, the same mitochondrial transport defects were detected in MNs

generated from hESC in which two different mutant *FUS* genes were inducibly overexpressed from within the *AAVS1* locus, whereas wildtype *FUS* overexpression had no effect. This is comparable to a previous study detecting axonal branching and growth defects in primary neuronal cultures of mice overexpressing mutant *FUS* (P525L and R521H), whereas no defects were observed after overexpression of wildtype *FUS*⁴⁶. Overexpression of *caz*, the *Drosophila* orthologue of human *FUS* in flies, did also not induce axonal transport defects, whereas *caz* variants mimicking mutant *FUS* also induced mitochondrial transport defects¹⁷. Both gain-of-function and loss-of-function mechanisms have been proposed as the basic mechanism underlying the pathogenic effect of mutations in *FUS*. Our data

strongly suggest that at least the defects in axonal transport are due to a gain of function of mutant FUS-related toxicity, which is also consistent with recent studies in a mouse model⁴⁷. In a recent study, inhibition of the mitochondrial localization of TDP-43 can prevent mitochondrial dysfunction and neuronal loss in a TDP-43^{M337V} mouse model. This indicates that there is a link between TDP-43 localization and mitochondrial movement, which may also be true for FUS⁴⁸.

To gain insights into the mechanism(s) underlying the axonal transport defects in mutant FUS MNs, we first assessed cytoskeletal changes. Although a previous study demonstrated that NFL was decreased in mutant SOD1 iPSC MNs⁴⁹, we did not observe any significant changes in the staining for NFL in both patient and control cells. Next, we investigated whether MAMs were affected by FUS mutations. MAMs have multiple functions including lipid synthesis, mitochondrial dynamics, Ca²⁺ homeostasis, ER stress, intracellular trafficking, and autophagy¹⁹. Overexpression of TDP-43 was reported to cause MAM disruption *in vivo* and *in vitro*²¹. In a recent report, FUS was suggested to activate GSK-3 β , which disrupts MAMs through a VAPB–PTPIP51 interaction²². By staining for both mitochondria and ER, we found that overlap of ER and mitochondrial markers was significantly lower in FUS compared with the control MNs. A limitation of our study is that we could only estimate the MAM reduction using stainings. As MAMs represent a very small region where the distance between mitochondria and ER is limited to 10–30 nm, and where only 5–20% of the mitochondrial surface is closely connected to the ER membranes¹⁹, it is difficult to accurately quantify the percentage of MAMs. As another readout for MAM integrity, phospholipid release by FUS-mutant MNs was assessed. This demonstrated significantly decreased PC release by FUS-mutant MNs, which was reversed following genetic correction.

FUS can bind and regulate mRNAs of several motor proteins including KIF5C, KIF1B, and KIF3A⁵⁰. All these motor proteins are involved in axonal transport of mitochondria and vesicles. KIF5C belong to the Kinesin1 family, which drives anterograde (=synapse directed) transport of mitochondria along axons⁵¹. An outer mitochondrial protein, Mirol, connects mitochondria with Kinesin1⁵¹. Mirol preferentially localizes in MAM sites and part of the ER will be transported together with mitochondria based on this association⁵¹. It could be that if MAMs decrease, axonal transports will decrease because of this reduced Mirol linkage.

We could rescue both mitochondrial and ER vesicle transport defects by using two different HDAC6 inhibitors. HDAC6 inhibition also increased the total number of ER vesicles. These compounds had no effect on healthy control-derived MNs indicating that axonal transport is already maximal and cannot be increased by inhibiting deacetylation in these cells. Knockdown of HDAC6 using ASOs also resulted in the same rescue effects on the axonal transport. This did not only confirm that HDAC6 has an important role in this rescue effect, it also confirms the specificity of the pharmacological HDAC6 inhibitors, used in our study. It was reported before that the mRNA expression of HDAC6 was regulated by a TDP-43 and FUS complex²⁸. However, we did not observe any downregulation of HDAC6 expression in MNs derived of mutant FUS iPSCs. In line with the rescue of axonal transport deficits in DRG neurons from a mouse model of CMT2 and in a *Drosophila* model of Parkinson disease^{23, 52}, we believe that the therapeutic effect of HDAC6 inhibitors could be related to a more general effect due to the increase of the acetylation level of α -tubulin in the microtubules, rather than a (mutant) FUS-specific effect. This is also in line with the observation that genetic deletion of HDAC6 in an ALS mouse model with mutant SOD1^{G93A} extended the lifespan of these mice by maintaining the integrity of the motor axon, whereas there was no effect on the disease onset²⁷. Our hypothesis illustrated in Fig. 6d is that an increased acetylation of

α -tubulin increases the proportion of motor proteins binding to the microtubules, which results in more axonal transport of mitochondria and ER vesicles along the axons. This increased binding overcomes the axonal transport defects induced by different stressors, including mutations in FUS.

Both Tubastatin A and ACY-738 are considered as being specific HDAC6 inhibitors. Although Tubastatin A has a higher selectivity, the advantage of ACY-738 is that it has a better capability to cross the blood–brain–barrier and that a related compound (ACY-1215, also called ricolinostat) is in clinical trials without reported side effects until now⁵³. As a consequence, pharmacological HDAC6 inhibition seems to be an interesting strategy to counteract general axonal transport defects, which correlates with an increased acetylation of α -tubulin.

In conclusion, our study showed that point mutations in FUS result in clear defects in MNs derived from FUS-ALS patients, which is confirmed by gene editing and overexpression approaches. Furthermore, we can rescue the defects pharmacologically by HDAC6 inhibition and by genetic silencing of HDAC6, which suggests that this could become a new therapeutic strategy for ALS.

Methods

Generation of iPSCs from fibroblasts. Primary human fibroblasts were obtained from skin biopsies of ALS patients and controls with the approval of the ethical committee of the University Hospitals Leuven (S80354). The 1/1 and 2/2 samples were obtained from a 33-year-old and a 71-year-old female patient, respectively. Both of these patients carry a R521H mutation in FUS. The 3/1 sample is from a 17-year-old male patient carrying a *de novo* P525L FUS mutation. The 3/2 and 3/3 samples are from the unaffected parents of patient 3/1. The 2/1 sample is from a presymptomatic patient carrying a R521H mutation. Human iPSC lines were generated by using the CytoTune[®]-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen). Reprogramming factors (Klf4, Oct3/4, Sox2, and cMyc) were transfected by using non-integrating Sendai virus vectors from the kit. The clearance of these Sendai-virus vectors was confirmed by using TaqMan[®] iPS Sendai Detection Kit (Invitrogen). Control BJ1 iPSC were generated from BJ fibroblasts (ATCC[®] CRL-2522[™]). The 4/1 and 4/2 are published healthy control iPSCs¹¹.

Gene correction of iPSCs. Creation of isogenic controls of iPSC carrying the R521H mutation in FUS was performed by CellSystems (Troisdorf, Germany). iPSCs were transfected with gRNA vector, Cas9 vector, and donor DNA. Transfected cells were selected with puromycin for 2 days. Single clones were genotyped with genomic DNA PCR and subsequently sequenced. The absence of the FUS mutation was confirmed by this sequencing.

Recombinase-mediated cassette exchange in hESCs. The FRT-containing hESC line H19 (WA09) was purchased from WiCell Research Institute (Madison, USA) and used for recombinase-mediated cassette exchange to establish the FUS hESC overexpressing FUS. Wildtype FUS cDNA sequences were purchased from OriGene Technologies (Rockville, USA). Point mutations were introduced by PCR and the cDNA was inserted into the *AgeI* and *MluI* sites of the pZ/F3-P-Tet-On-3f-tet-F plasmid (constructed by the lab^{34, 35}) to replace the tdt cassette to allow inducible FUS expression. The RMCE protocol used was described before^{34, 35}. Puromycin (100–200 ng/ml) and 0.5 μ M 1-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil (FIAU) were used for colony selection. All PCR primers are listed in Supplementary Table 2.

Cell cultures. hESCs and human iPSCs were maintained on Geltrex LDEV-Free hESC-Qualified Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (A1413302, Gibco[™]) in Essential[™] 8 medium (A1517001, Gibco[™]) with 1000 U/ml penicillin–streptomycin. Colonies were routinely passaged with 0.5 mM EDTA (15575-020, Invitrogen) in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). Cultures were routinely analyzed by PCR for mycoplasma contamination.

Teratoma formation and analysis. iPSCs were collected through enzymatic dissociation, 5–10 \times 10⁶ cells were resuspended in 100 μ l phosphate-buffered saline (PBS) and injected with 100 μ l matrigel (Becton Dickinson) subcutaneously in the back of immunodeficient RAG2-*g*-*g*-*g* mice. Tumors generally developed within 4–8 weeks. Animals were killed for dissection. Teratomas were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, washed in 70% ethanol and subsequently embedded in paraffin. After sectioning, the presence of cells from the three germ layers was assessed following hematoxylin and eosin staining. Hematoxylin–eosin staining was performed by incubating sections for 2.5 min in Harris' hematoxylin, washing with water for 10 min, and incubation for 10 s in 0.01 g/ml eosin. These experiments were approved by the Ethical Committee for animal experiments of the KU Leuven.

Differentiation of MNs from iPSCs or hESC. Motor neuron differentiation was performed as described before, with some modifications³². iPSC clones were treated with collagenase type IV to form small clusters and resuspended in Essential™ 8 medium. During the first 2 days, medium was changed every day with Neuronal basic medium (DMEM/F12 plus Neurobasal medium with N2 and B27 supplement without vitamin A) supplemented with 40 μM SB431542 (Tocris Bioscience), 0.2 μM LDN-193189 (Stemgent), 3 μM CHIR99021 (Tocris Bioscience), and 5 μM Y-27632 (Merck Millipore). From day 3 on, 0.1 μM retinoic acid (Sigma) and 500 nM SAG (Merck Millipore) was added. From day 8 on, BDNF (10 ng/ml, Peprotech) and GDNF (10 ng/ml, Peprotech) were added. DAPT (20 μM, Tocris Bioscience) was added on day 9. Floating clusters were dissociated into single cells for plating on day 11 by using 0.05% trypsin (Gibco™). Motor neuron progenitors were subsequently plated on laminin (20 μg/ml)-coated 12-well plates at 0.5–2 × 10⁵ cells per well. From day 17 on, the cells were switched to motor neuron maturation medium supplemented with BDNF, GDNF, and CNTF (each 10 ng/ml, Peprotech) to keep long term cultures. Media were changed every other day by replacing half of the medium. For rescue experiments, motor neurons were treated overnight with either 1 μM Tubastatin A (Sigma), 1 μM ACY-738 (Acetylon Pharmaceuticals Inc, Boston, USA) or an equivalent amount of DMSO.

Unassisted delivery of ASOs. Locked Nucleic Acid (LNA™) oligonucleotides for FUS and HDAC6 were purchased from Exiqon (Vedbaek, Denmark). Motor neuron progenitors were seeded at low plating density of 0.5 × 10⁵ cells per well (12 well plate) at day 10 of motor neuron differentiation. At day 25, oligonucleotides dissolved in sterilized water were added and mixed. The LNA oligonucleotides were used at a final concentration of 50 nM. The total incubation time before cell lysis or axonal transport analysis was 1 week.

Patch-clamp experiments. Patch-clamp recordings of iPSC-derived MNs were performed at room temperature with an inverted microscope (Zeiss) and an EPC-10 amplifier (HEKA)⁴³. Whole-cell recordings were low-pass filtered and digitized at 2.9 and 10 kHz, respectively. Patch Master software (HEKA) was used for recording and for the final evaluation of the data. Borosilicate glass pipettes (Science Products) were pulled and polished to yield a resistance of 3–4 MΩ when filled with the internal solution (153 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, and 2 mM Mg-ATP, calibrated to pH 7.3 with KOH; 305 mOsm). Pharmacological compounds were applied to the external bath solution (142 mM NaCl, 8 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 6 mM MgCl₂, 10 mM glucose, and 10 mM HEPES, calibrated to pH 7.4 with NaOH; 325 mOsm). NBQX (10 μM, Sigma) or bicuculline (10 μM, Sigma) were applied via gravity through the modified SF-77B perfusion fast-step system (Warner Instruments).

Real-time PCR and sequence analysis. RNA was isolated using an RNeasy kit (Qiagen) and reverse transcription was performed using SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR (Invitrogen). Quantitative RT-PCR was performed using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™) on the 7500 Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). All samples were run in triplicate and relative quantification was done using the ΔΔC_t method with normalization to GAPDH. A list of primers can be found in Supplementary Table 2. Genomic DNA was isolated using a DNeasy kit (Qiagen) and sequencing was performed by IGC Genomics (Teddington, UK). The TaqMan® hPSC Scorecard™ Panel (Life Technologies—A15870—hPSC scorecard panel 384) kit was used to determine the expression of markers from the three germ layers.

Western blotting and ELISA. Cells were manually collected on ice and fresh-frozen cell samples were maintained at –80 °C until further processing. Samples were hydrolyzed in RIPA buffer (containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% (vol/vol) NP40, 0.5% sodium deoxycholate (wt/vol), 0.1% SDS (wt/vol) complemented with protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, pH 7.6). Protein concentrations were determined using the microBCA kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) according to the manufacturer's instructions. Western blotting was performed as described before⁴⁹. Optical densities were determined using the integrated density measurement tool of ImageJ (NIH).

For ELISA, the Phosphatidylcholine Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision) was used to detect phosphatidylcholine level in motor neuron culture medium according to the manufacturer's instructions. The medium was collected after 2 days incubation with cells. No dilution was needed for the measurements. Absorbance was measured at 540 nm. Because of the large variation in absolute values between different batches, representative experiments are shown.

Immunocytochemistry. Cells plated on coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature and were washed with PBS. Permeabilization and blocking was done for 30 min using PBS containing 0.2% Triton X-100 (Acros Organics) and 5% donkey serum (Sigma) for 1 h. Cells were incubated overnight at 4 °C in blocking buffer (2% donkey serum) containing the different primary antibodies (Abs). After washing with PBS, cells were incubated

with secondary Abs (Invitrogen) for 1 h at room temperature. Primary Abs and dilutions are listed in Supplementary Table 3.

Fluorescent and bright field micrographs were captured using a Zeiss Axio Imager M1 microscope (Carl Zeiss) equipped with an AxioCam MRc5 (bright field, Carl Zeiss) or a monochrome AxioCam Mrm camera (fluorescence, Carl Zeiss). Images were analyzed using ImageJ with Coloc2 plug-in. Pearson's correlation coefficients were used for expressing the intensity correlation for colocalization.

Axonal transport analysis. Motor neurons (day 24, 31, and 38) from patients and controls were loaded with MitoTracker-Red (50 nM, Invitrogen) or ER Tracker-Red (1 μM, Invitrogen), washed and left to equilibrate (20 min) in motor neuron maturation medium, before transferring them to a HEPES buffered salt solution (pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 10 mM HEPES). Measurements were performed on an inverted Zeiss Axiovert 200 M microscope (Carl Zeiss) with a ×40 water immersion lens.

Motor neurons were selected under differential interference optics (DIC) based on typical morphology consisting of a soma and long-extended neurites. Both MitoTracker-RED and ER Tracker-Red were excited at 580 nm, using a TILL Poly V light source (TILL Photonics) and image sequences were recorded (200 images at 1 Hz) onto a cooled CCD camera (PCO Sensicam-QE) using TILLVISION (TILL Photonics) software. A heated gravity-fed perfusion system was used to keep cells at 36 ± 0.5 °C during the recordings.

All image analysis was performed in Igor Pro (Wavemetrics) using custom-written routines based on a previously described analysis algorithm⁵⁴. In brief, kymographs or spatio-temporal maps were constructed for each of the neuronal processes. In these maps, stationary mitochondria appear as vertical lines and moving mitochondria generate tilted lines. Proportions of moving and stationary mitochondria were extracted from the maps by marking and analyzing the properties of each of the mitochondrial trajectories.

Electron microscopy. MNs were plated on plastic coverslips on the tenth day of differentiation. On day 38, cells were fixed and processed for embedding and ultrathin sectioning. Subsequently, the samples were contrasted with uranyl acetate and lead citrate as described before⁵⁵. MNs were identified by their morphology and were analyzed by using a JEOL JEM1400 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan). Digital acquisitions were taken by a numeric camera (Quemesa Soft Imaging System, Berlin, Germany).

Statistical analysis. A minimum of three independent experiments based on three different differentiation batches was always performed. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism version 5.0b.

Mann-Whitney test were used as statistical analysis for patch clamp data. One-way ANOVA was used for the other experiments with post-hoc Tukey's test to determine statistical differences between groups. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001 were considered significant. Data values represent mean ± SEM, unless indicated otherwise.

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

Received: 22 November 2016 Accepted: 4 August 2017

Published online: 11 October 2017

References

- Renton, A. E., Chiò, A. & Traynor, B. J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* **17**, 17–23 (2014).
- Bensimon, G., Lacomblez, L. & Meininger, V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N. Engl. J. Med.* **330**, 585–591 (1994).
- Poppe, L., Rué, L., Robberecht, W. & Van Den Bosch, I. Translating biological findings into new treatment strategies for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Exp. Neurol.* **262**, 138–151 (2014).
- Arbab, M., Baars, S. & Geijsen, N. Modeling motor neuron disease: the matter of time. *Trends Neurosci.* **37**, 642–652 (2014).
- Lanson, N. A. & Pandey, U. B. FUS-related proteinopathies: lessons from animal models. *Brain Res.* **1462**, 44–60 (2012).
- Kwiatkowski, T. J. et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**, 1205–1208 (2009).
- Vance, C. et al. Mutations in FUS, an RNA Processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* **323**, 1208–1211 (2009).

8. Dormann, D. & Haass, C. Fused in sarcoma (FUS): An oncogene goes awry in neurodegeneration. *Mol. Cell Neurosci.* **56**, 475–486 (2013).
9. Lattante, S., Rouleau, G. A. & Kabashi, E. TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Hum. Mutat.* **34**, 812–826 (2013).
10. Liu, X. et al. The fused in sarcoma protein forms cytoplasmic aggregates in motor neurons derived from integration-free induced pluripotent stem cells generated from a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the FUS-P52S mutation. *Neurogenetics* **16**, 223–231 (2015).
11. Liu, M. L., Zang, T. & Zhang, C. L. Direct lineage reprogramming reveals disease-specific phenotypes of motor neurons from human ALS patients. *Cell Rep.* **14**, 115–128 (2016).
12. Ichyanagi, N. et al. Establishment of in vitro FUS-associated familial amyotrophic lateral sclerosis model using human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* **6**, 496–510 (2016).
13. Naujock, M. et al. 4-Aminopyridine induced activity rescues hypoelectable motor neurons from amyotrophic lateral sclerosis patient-derived induced. *Stem Cells* **34**, 1563–1575 (2016).
14. Wainger, B. J. et al. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep.* **7**, 1–11 (2014).
15. Devlin, A.-C. et al. Human iPSC-derived motoneurons harbouring TARDBP or C9ORF72 ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability. *Nat. Commun.* **6**, 1–12 (2014).
16. Fischer, L. R. et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* **185**, 232–240 (2004).
17. Baldwin, K. R., Godena, V. K., Hewitt, V. L. & Whitworth, A. J. Axonal transport defects are a common phenotype in *Drosophila* models of ALS. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 2378–2392 (2016).
18. De Vos, K. J. & Hafnerparast, M. Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research? *Neurobiol. Dis.* **105**, 283–299 (2017).
19. Pallusson, S. et al. There's something wrong with my MAM, the ER-mitochondria axis and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **39**, 146–157 (2016).
20. Raturi, A. & Simmen, T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1833**, 213–224 (2013).
21. Stoica, R. et al. ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat. Commun.* **5**, 3996 (2014).
22. Stoica, R. et al. ALS/FTD-associated FUS activates GSK-3 β to disrupt the VAPB-PTPIP51 interaction and ER-mitochondria associations. *EMBO Rep.* **17**, 1326–1342 (2016).
23. d'Yewalle, C. et al. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Med.* **17**, 968–974 (2011).
24. Hubbert, C. et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458 (2002).
25. Sainath, R. & Gallo, G. The dynein inhibitor Ciliobrevin D inhibits the bidirectional transport of organelles along sensory axons and impairs NGF-mediated regulation of growth cones and axon branches. *Dev. Neurobiol.* **75**, 757–777 (2014).
26. Reed, N. A. et al. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* **16**, 2166–2172 (2006).
27. Taes, I. et al. Hdac6 deletion delays disease progression in the SOD1^{G93A} mouse model of *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1–23 (2013).
28. Kim, S. H., Shanware, N. P., Bowler, M. J. & Tibbets, R. S. Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA. *J. Biol. Chem.* **285**, 34097–34105 (2010).
29. Fiesel, F. C. et al. Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. *EMBO J.* **29**, 209–221 (2010).
30. Miskiewicz, K. et al. HDAC6 is a bruchpilot deacetylase that facilitates neurotransmitter release. *Cell Rep.* **8**, 94–102 (2014).
31. Bäumer, D. et al. Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations. *Neurology* **75**, 611–618 (2010).
32. Maury, Y. et al. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat. Biotechnol.* **33**, 89–96 (2014).
33. Kisilev, E. et al. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell* **14**, 781–795 (2014).
34. Ordóñez, L. et al. Efficient recombinase-mediated cassette exchange in hPSCs to study the hepatocyte lineage reveals AAVS1 locus-mediated transgene inhibition. *Stem Cell Rep.* **5**, 918–931 (2015).
35. Ordóñez, L. et al. Rapid and efficient generation of recombinant human pluripotent stem cells by recombinase-mediated cassette exchange in the AAVS1 locus. *J. Vis. Exp.* **117**, e54718 (2016).
36. Lagace, T. A. & Ridgway, N. D. The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1833**, 2499–2510 (2013).
37. Kornmann, B. et al. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* **325**, 477–481 (2009).
38. Friedman, J. R., Webster, B. M., Mastromarino, D. N., Verhey, K. J. & Voeltz, G. K. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* **190**, 363–375 (2010).
39. Bußer, K. V. et al. Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 10842–10846 (2010).
40. Majid, T., Griffin, D., Criss, Z., Jarpe, M. & Pautler, R. G. Pharmacologic treatment with histone deacetylase 6 inhibitor (ACY-738) reverses Alzheimer's disease phenotype in amyloid precursor protein/presenilin 1 (APP/PS1) mice. *Alzheimers Dement Transl. Res. Clin. Interv.* **1**, 170–181 (2015).
41. Shelkova, T. A. Modelling FUSopathies: focus on protein aggregation. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1613–1617 (2013).
42. Wolozin, B. Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* **7**, 56 (2012).
43. Williamson, T. L. & Cleveland, D. W. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat. Neurosci.* **2**, 50–56 (1999).
44. Zhang, B., Tu, P. H., Abtahian, F., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. Y. Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J. Cell Biol.* **139**, 1307–1315 (1997).
45. MacAskill, A. F. & Kittler, J. T. Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol.* **20**, 102–112 (2010).
46. Groen, E. J. N. et al. ALS-associated mutations in FUS disrupt the axonal distribution and function of SMN. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 3690–3704 (2013).
47. Sharma, A. et al. ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nat. Commun.* **7**, 10465 (2016).
48. Wang, W. et al. Motor-coordinative and cognitive dysfunction caused by mutant TDP-43 could be reversed by inhibiting its mitochondrial localization. *Mol. Ther.* **25**, 127–139 (2017).
49. Chen, H. et al. Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell* **14**, 796–809 (2014).
50. Hoell, J. I. et al. RNA targets of wild-type and mutant FET family proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1428–1431 (2011).
51. MacAskill, A. F. et al. Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron* **61**, 541–555 (2009).
52. Godena, V. K. et al. Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations. *Nat. Commun.* **5**, 5245 (2014).
53. Falkenberg, K. J. & Johnstone, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 673–691 (2014).
54. Vanden Bergh, P., Hennig, G. W. & Smith, T. K. Characteristics of intermittent mitochondrial transport in guinea pig enteric nerve fibers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **286**, G671–G682 (2004).
55. Urwyler, O. et al. Investigating CNS synaptogenesis at single-synapse resolution by combining reverse genetics with correlative light and electron microscopy. *Development* **142**, 394–405 (2015).

Acknowledgements

We thank Sarah Debray and Joni Vanneeste for their help with iPSC culturing. We thank Balazs Toth for the initial guidance with the patch clamp experiments. We thank Franziska Bursch for helping with the patch clamp experiments. We thank Steven Boeynaems, Elke Bogert and Benjamin Gille for guidance with the data analysis. We thank Dr Haibo Wang and Prof Muralidhar L. Hegde for warm help and nice discussions. This work was supported by the KU Leuven (C1 and "Opening the Future" Fund), the "Fund for Scientific Research Flanders" (FWO-Vlaanderen), the Agency for Innovation by Science and Technology (IWT; SBO-IPSCAF), the Belgian Government (Interuniversity Attraction Poles Programme P7/16 initiated by the Belgian Federal Science Policy Office), the Thierry Latran Foundation, the "Association Belge contre les Maladies neuro-Musculaires" (ABMM), the FWO-Vlaanderen under the frame of E-RARE-2, the ERA-Net for Research on Rare Diseases (PYRAMID), the EU Joint Programme - Neurodegenerative Disease Research (JPNDR) projects (STRENGTH and RiMod-FTD), the ALS Liga België (A Cure for ALS) and the Flemish government-initiated Flanders Impulse Program on Networks for Dementia Research (VIND). W.G. is supported by the China Scholarship Council (CSC). W.R. is supported through the E.

von Behring Chair for Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders, Geneeskundige Stichting Koningin Elisabeth (G.S.K.E.) and the European Research Council under the European's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013)/ ERC grant agreement No. 340429. W.B. is a postdoctoral fellow of FWO. P.V.D. holds a senior clinical investigatorship of FWO-Vlaanderen. F.W. and S.P. are supported in part by the Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke and the Initiative Therapieforschung ALS e.V., including the contribution of Elmar Siger in memory of his wife Ingrid. D.B. thanks ANR (LabEx Revire, Investissement d'Avenir, ANR-10-LABX-73) and the Association Française contre les Myopathies (AFM grant 16465) for their financial support. C.L. is a PhD fellow supported by ANR-10-LABX-73.

Author contributions

W.G. planned and performed most of the experiments. M.N. planned and performed the patch clamp measurements. L.F. helped with the iPSC differentiations and organized the schematic graph of MN differentiation. P.B. provided support for the electron microscopy experiments. L.O. and R.B. helped with the construction of inducible hESC lines. A.P., M.W. and Th.V. helped with the iPSC technology. V.R., W.B. and P.V.B. helped with the axonal transport measurements and P.V.B. wrote the axonal transport analysis software. M.J. provided ACY-738. T.T. and N.G. provided technical support. Jo.S. helped with the images and T.L.V. was involved in the ASO experiments. P.V.D. provided fibroblasts and ideas for the project. F.W. and S.P. supervised part of the iPSC differentiation and the patch clamp recordings of motor neurons. Ja. S contributed to the additional iPSC control lines in the patch clamp recordings. F.W., S.P. and W.R. provided ideas for the project. D.B. and C.L. provided the motor neuron differentiation protocol. L.V.D.B. and C.V. planned and supervised the project. W.G. and L.V. D.B. wrote the paper.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at doi:10.1038/s41467-017-00911-y.

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

III. ANALYSE DES EFFETS D'UNE NOUVELLE MOLECULE A POTENTIEL THERAPEUTIQUE

1. QU'EST-CE QUE NEUROVITAS ?

Les composés Neurovita (NVs) ont été développés par l'équipe du Dr. Lafon (Institut Pasteur, Paris) (Préhaud et al., 2010, 2014). Ces polypeptides dérivent de la protéine d'enveloppe, la protéine G, du virus de la rage.

Le virus de la rage se reproduit uniquement dans le système nerveux et voyage depuis la morsure infligée par un animal enragé qui inocule la salive contaminée dans les muscles et les terminaisons nerveuses, jusqu'aux glandes salivaires. Les particules virales sont excrétées dans la salive, ce qui permet l'infection d'un nouvel hôte. Au cours de son long voyage dans le système nerveux, passant d'un neurone au neurone suivant et, en contraste frappant avec d'autres infections neurotropes, le virus de la rage n'induit pas la mort des neurones qu'il infecte (Lafon, 2011). La virulence des souches de virus de la rage corrèle avec leur capacité de promouvoir la survie neuronale (Seo et al., 2017).

L'équipe du Dr Lafon a découvert que le virus rabique a développé des mécanismes robustes lui permettant d'activer les voies de survie du neurone. Ce mécanisme est contrôlé par la protéine d'enveloppe, la protéine G, dont l'extrémité C-terminale code pour un motif de liaison PDZ (PBM), ce qui lui permet d'interagir avec un partenaire cellulaire, une kinase associée aux MTs, MAST2, en formant un complexe protéine-protéine de type PDZ-PBM. Il est probable que la protéine G active la survie neuronale en bloquant l'action de PTEN, un inhibiteur de la neuritogénèse et de la survie neuronale, en délogeant PTEN du complexe qu'il forme avec le PDZ de MAST2. L'équipe a montré qu'un peptide dont la séquence comprend le domaine cytoplasmique de la protéine G reproduisait la propriété neuroprotectrice de la protéine G au cours de l'infection. La partie active de la protéine G et le peptide résultant a été nommé Neurovita (NV). Lorsqu'il est administré par des vecteurs viraux (lentivecteur ou AAV2), NV favorise la neuritogénèse, la neuroprotection contre les agressions toxiques mais également la régénération des neurites après section. Les effets de neuroprotection et de neuritogénèse de NV ont été mis en évidence dans plusieurs modèles dont la protection d'une lignée issue d'un neuroblastome humain (SH-SY5Y) face au stress oxydatif (H₂O₂), ou la régénération des neurites de neurones d'une lignée cellulaire humaine (NT2-N) après lésion (Préhaud et al., 2014).

La séquence de Neurovita a été optimisée et a donné lieu à la construction de trois peptides (appelés NV1, NV2 et NV3). NV Δ est une séquence contrôle dépourvue de la zone active.

2. EFFETS DE NEUROVITAS SUR LES MOTONEURONES HUMAINS DERIVES DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES

Etant donné ses propriétés neuroprotectrices et de neuritogénèse, nous avons voulu évaluer si nous pouvions avoir un effet des polypeptides NVs sur des MNs dérivés d'iPSC porteurs ou non de mutations SLA.

Afin d'évaluer le pouvoir de neuritogénèse des NV, nous avons mis en place un protocole nous permettant de quantifier la croissance des neurites après un stress « mécanique » subséquent à la dissociation des MNs ayant déjà formés un réseau neuronal important. Après la dissociation des MNs à T0 (**Fig.1A, Article 1**) avec de l'Accutase, les cellules ont étéensemencées à très faible densité afin de pouvoir quantifier la longueur et le nombre de neurites par neurone de façon automatique avec un imageur couplé à une plateforme de criblage (Cell-Insight) (Thermo Fisher Scientific Inc.). Après dissociation, les MNs dérivés d'iPSC issues de contrôles et de patients porteurs de la mutation *SOD1*^{N139D} et des expansions G4C2 au niveau du gène *C9ORF72* ont été transduits avec les vecteurs lentiviraux codant pour les polypeptides NV1, NV2, NV3 ou le

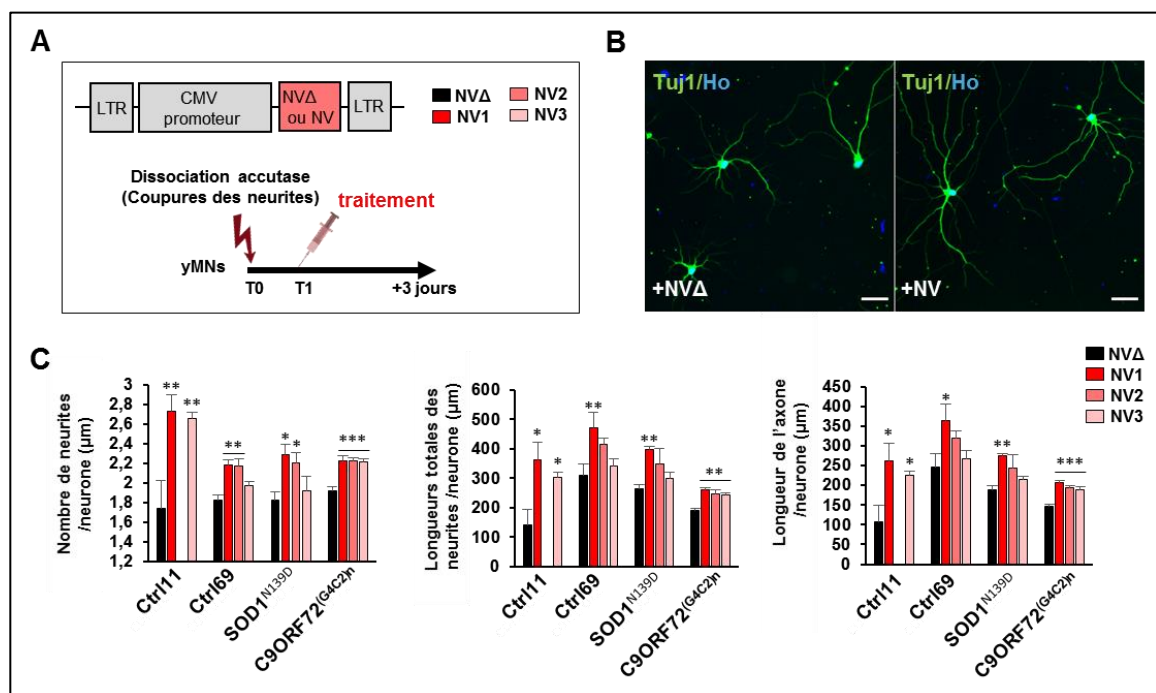


Figure 1 | Effet des molécules Neurovitas sur la neuritogénèse. (A) (Haut) L'expression des peptides Neurovitas (NV) est permise par la transduction lentivirale de la séquence NV sous le contrôle du promoteur du cytomegalovirus (CMV). Trois peptides ont été testés : NV1, NV2 et NV3. Le NVΔ est le peptide contrôle, sans la séquence active. (Bas) Après dissociation des jeunes MNs, les cellules ont étéensemencées à très faible densité puis transduites avec les vecteurs codants pour NV1, NV2, NV3 ou NVΔ (traitements). **(B)** Images représentatives de MNs fixés puis marqués avec des anticorps anti-β3tubuline (Tuj1) trois jours après la transduction. Ho : Hoescht. Echelle : 20µm **(C)** Graphes montrant la quantification du nombre de neurites (gauche), la longueur totale des neurites (milieu) et la longueur moyenne de l'axone (droite) par neurone. Plus de 500 neurones par puitsensemencés ont été imagés et analysées automatiquement par le Cell-Insight. Les peptides NVs, notamment le NV1, ont augmenté le nombre et la longueur des neurites dont la longueur des axones des MNs dérivés de deux contrôles différents et de MNs porteurs de la mutation *SOD1*^{N139D} et des expansions G4C2 au niveau du gène *C9ORF72*. Données préliminaires : n=3 puits, ANOVA one-way avec Dunnett test.

polypeptide dépourvu du site actif (NVΔ) (**Fig 1A**). Trois jours plus tard, les MNs ont été fixés puis marqués avec un anticorps anti- β 3tubuline dans le but de quantifier la neuritogénèse (**Fig 1B**).

Les résultats des quantifications réalisées avec le Cell-Insight sont présentés sur la figure XC. Trois quantifications ont été réalisées : le nombre de neurites par neurone, la longueur totale des neurites par neurone et la longueur de l'axone (considéré comme le neurite le plus long). Les résultats ont montré que chacun des composés, et notamment le composé NV1, augmentait de manière significative le nombre et la longueur des neurites par neurone, dont l'axone. Les effets positifs significatifs ont été montrés sur des MNs contrôles mais aussi sur des MNs issus de patients atteints de SLA (**Fig 1C**).

Ces premiers résultats suggèrent que les polypeptides NVs pourraient être de nouveaux candidats à visée thérapeutique dans la SLA. Les résultats sur les MNs contrôles (qui ont été reproduits) seront inclus dans une publication du Dr. Lafon en cours de préparation (*Khan Z, Terrien E, Lefebvre-Omar C, Bohl D, Vitry S, Lafon, M, Wolff N, Prehaud C. Peptides targeting the PDZ domain of MAST2 are efficient inducers of neuritogenesis. A structure–function analysis*).

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Ces analyses seront répétées afin de les confirmer. Des MNs issus de patients mutés au niveau du gène TARDBP seront également inclus. De même pour des clones isogéniques corrigés avec le système CRISPR/CAS9 qui sont en cours de caractérisation pour les 2 mutations ponctuelles étudiées. Ensuite, nous étudierons si les NVs peuvent restaurer ou non les phénotypes que nous avons observés sur les MNs issus d'individus atteints de SLA. Enfin, l'équipe du Dr. Lafon est actuellement en train de mettre au point une technique pour administrer NV dans des neurones sous forme de protéines. Cette construction appelée Neurocargo-Neurovita a été obtenue en greffant NV à un anticorps de lama capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et la membrane plasmique des neurones. Cette construction permettrait ainsi d'administrer des peptides NVs sans utiliser de vecteurs viraux, facilitant ainsi le transfert vers des applications thérapeutiques (Préhaud et al., 2016).

I. GENERATION DES iPSC

L'équipe a généré des clones d'iPSC issus de 4 patients atteints de SLA (1 individu muté au niveau du gène *SOD1*^{N139D}, 2 individus porteurs d'expansions au niveau du gène *C9ORF72* et 1 individu muté au niveau du gène *TARDBP*^{G348C}), ainsi que des clones d'iPSC issus de trois individus contrôles de 11, 33 et 69 ans.

Une des difficultés de travailler avec ce modèle cellulaire est la variabilité qu'il peut y avoir entre chaque clone d'iPSC, d'où la nécessité de toujours confirmer les phénotypes observés dans plusieurs d'entre eux (Li et al., 2015; Sgodda and Cantz, 2013; Soldner and Jaenisch, 2012, 2017). Il peut logiquement exister des variations entre les clones de différents patients, mais aussi entre clones provenant d'un même individu (Sgodda and Cantz, 2013). Les sources d'hétérogénéité sont présentes à plusieurs niveaux listées ci-dessous.

LA BIOPSIE

L'hétérogénéité est déjà présente dans la biopsie de peau à partir de laquelle les iPSC seront reprogrammées (Li et al., 2015; Sgodda and Cantz, 2013) mais il est impossible d'aller sélectionner une cellule spécifique à reprogrammer (**Fig. 1**).

LA REPROGRAMMATION

Durant la reprogrammation de cellules somatiques en iPSC, il peut y avoir des effets liés aux facteurs de reprogrammation qui peuvent affecter le génome ou l'épigénétique. Afin de limiter ces effets, la reprogrammation avec des vecteurs non intégratifs (ex : virus « Sendai ») est privilégiée (Antony-Debré et al., 2013; Sgodda and Cantz, 2013). Les iPSC issues des contrôles de 11 et 33 ans ainsi que les iPSC porteuses de la mutation *TARDBP*^{G348C} ont été reprogrammées avec des virus intégratifs avant la publication de la technique de reprogrammation par des vecteurs non-intégratifs (technique choisie pour les autres reprogrammations).

Pour ces raisons, il est nécessaire de valider la pluripotence des iPSC obtenues (marquages membranaires tels que TRA1-60, SSEA4 et intracellulaires tels que OCT4, NANOG ou SOX2) ; de vérifier la réactivation de la télomérase ainsi que l'extinction des transgènes dans les cellules reprogrammées avec des vecteurs intégratifs. D'autre part il est important de vérifier l'intégrité du génome via des analyses en SNP Illumina et des caryotypes.

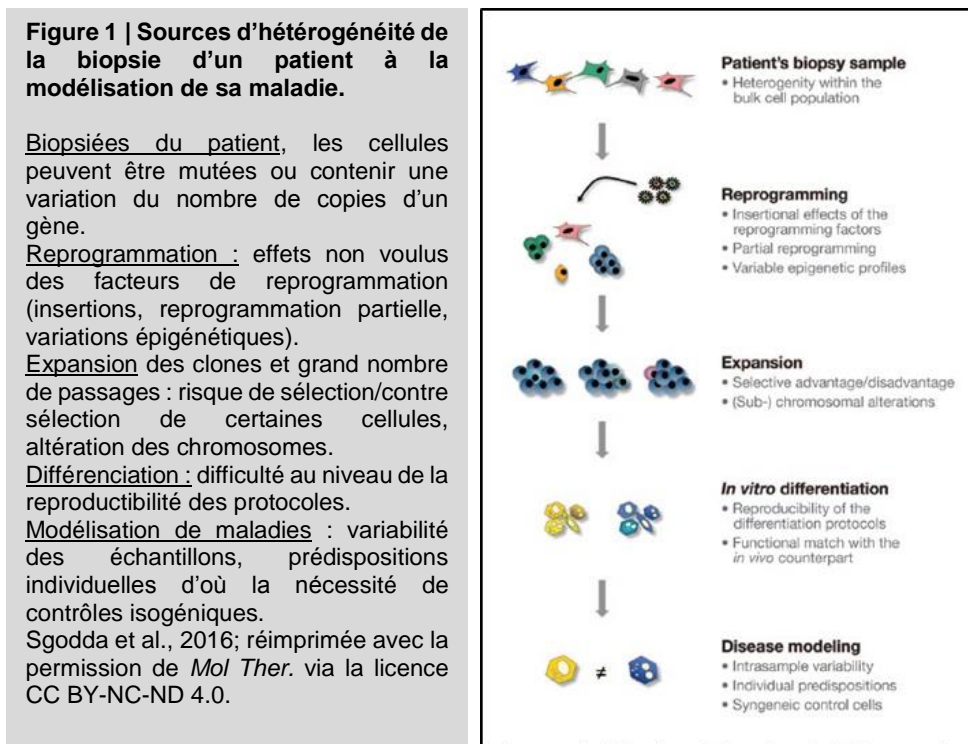
L'EXPANSION

Un des avantages des cellules iPSC est d'être une source illimitée de cellules pluripotentes humaines provenant directement d'un individu sain ou malade. Cependant, lors de l'expansion de clones et des passages, des altérations génétiques peuvent aussi se produire et une sélection des

cellules les moins vulnérables peut avoir lieu. Pour éviter ces problèmes, la qualité des iPSC est examinée régulièrement (Caryotypes et/ou SNP Illumina) tous les 5 à 10 passages. Mais pour s'assurer que les études sont réalisées sur des iPSC sans anomalies, des banques sont créées afin de toujours repartir des mêmes cellules dans les différentes expériences.

LA DIFFERENCIATION

Enfin, ces différences peuvent se répercuter sur la différenciation, et peuvent aussi être source d'hétérogénéité suivant les différentes expériences, d'où l'intérêt de mettre en place un protocole de différenciation très strict afin d'obtenir des populations homogènes et similaires à chaque manipulation (Sgodda and Cantz, 2013).



Dans le but de valider les observations phénotypiques liées à des mutations connues, il est aujourd'hui nécessaire d'utiliser des contrôles isogéniques. De plus en plus de publications inclues dans leurs travaux des iPSC isogéniques en utilisant la technologie CRISPR/Cas9 pour corriger des mutations (Bhinge et al., 2017; Guo et al., 2017a; Higelin et al., 2016; Imamura et al., 2017; Kruminis-Kaszkiel et al., 2018; Naumann et al., 2018; Selvaraj et al., 2018; Wainger et al., 2014). CRISPR/Cas9 est un outil qui permet de couper l'ADN à un site précis pour permettre une insertion ou une correction de mutation de façon très ciblée, y compris des expansions G4C2 du gène *C9ORF72* (LaMarca et al., 2018; Pribadi et al., 2016; Selvaraj et al., 2018). CRISPR/Cas9 est formé d'un complexe (Cas9, endonucléase d'ADN et un ARN guide) qui reconnaît une séquence d'ADN précise et peut faire une coupure double-brins de l'ADN. De cette façon il est possible de muter

précisément un gène ciblé. En ajoutant une matrice d'ADN, il est aussi possible d'introduire une nouvelle séquence. Alors que la plupart des études ont choisi de corriger les mutations dans les clones d'iPSC, un groupe a choisi d'insérer la mutation P525L dans le gène *FUS* afin de l'étudier (Lenzi et al., 2015; Naumann et al., 2018). Ils ont ainsi pu montrer un phénotype spécifique lié uniquement à la mutation. Dans un monde parfait, il faudrait avoir comme contrôle à la fois des iPSC mutées dans lesquelles le gène est corrigé et des iPSC contrôles dans lesquelles le gène muté est inséré.

Dans nos travaux, la génération des cellules iPSC isogéniques des mutations SOD1^{N139D} et TARDBP^{G348C} est actuellement en cours. Les MNs isogéniques SOD1^{N139N} et TARDBP^{G348G} ainsi qu'un deuxième clone du patient ¹C9ORF72 seront inclus aux données RNAseq actuellement disponibles pour permettre d'augmenter le pouvoir de l'étude. Nous pourrions ainsi vérifier si les MNs des deux patients porteurs d'expansions ont des profils transcriptomiques semblables. Nous pourrions aussi conclure si le fait que les MNs de patients C9ORF72 aient peu de gènes dérégulés soit « normal » ou pas. D'autre part, afin d'augmenter le nombre de patients inclus dans l'étude, d'autres iPSC ont été générées (patients sporadiques ou avec d'autres formes génétiques de SLA). Il serait intéressant d'avoir accès et/ou de participer à une banque de cellules souches issues de patients SLA pour augmenter le nombre de comparaisons, comme cela est le cas dans d'autres maladies (www.stembanc.org) ou dans d'autres domaines (www.projectmine.com). Cela serait d'autant plus intéressant pour les études concernant des MNs issus de patients sporadiques (dont l'étiologie génétique n'est pas connue) puisqu'il n'est pas possible de les comparer à des MNs isogéniques.

Une des critiques faites aux modèles basés sur cellules iPSC vient du « rajeunissement » des cellules (Tang et al., 2017). Une alternative serait la transdifférenciation qui est une technique qui permet d'obtenir des cellules différenciées à partir de cellules matures sans passer par le stade de cellule souche. Bien que cette technique permette de garder des marqueurs liés à l'âge (Liu et al., 2016; Mertens et al., 2018), le nombre de cellules initiales disponibles peut être limité puisqu'à la différence des cellules iPSC, les fibroblastes peuvent entrer en sénescence. D'autre part, pour les MNs en particulier, l'utilisation de vecteurs intégratifs pour l'expression forcée de facteurs de transcription induisant la transdifférenciation pose encore le problème de l'intégration virale (Abernathy et al., 2017; Liu et al., 2016; Son et al., 2011).

Li et al. ont montré qu'il était possible de produire des MNs directement à partir de fibroblastes de patients mutés au niveau du gène *FUS*. Ils y retrouvent les phénotypes liés à la SLA comme dans certaines études à partir d'iPSC (tels que l'hypoexcitabilité ou la mort cellulaire) (Liu et al., 2016). De même, *Shi et al.* ont montré que les MNs mutants *C9ORF72* dérivés de fibroblastes étaient plus sensibles au stress excitotoxique (Shi et al., 2018). Bien qu'observés de façon plus précoce, les phénotypes retrouvés dans les MNs dérivés de fibroblastes sont aussi observés dans les MNs dérivés d'iPSC. Si les MNs dérivés d'iPSC de patients récapitulent déjà des traits pathologiques par rapport au contrôle, elles devraient donc permettre de trouver des événements pathologiques précoces et donc des cibles thérapeutiques ou des biomarqueurs prometteurs.

II. GENERATION DES MOTONEURONES ET AMELIORATION DU MODELE

1. LES MOTONEURONES POUR ETUDIER LES MECANISMES INTRINSEQUES

Grâce à une analyse immunocytochimique et transcriptomique nous avons montré pour la première fois que les MNs générés avaient acquis un phénotype spinal avec des MNs présentant des caractéristiques de la partie rostrale de la colonne latérale de la moelle épinière, MNs généralement affectés dans la SLA.

Il serait intéressant de développer de nouveaux protocoles permettant de générer d'autres sous-types de MNs spinaux plus caudaux, notamment des MNs de la partie lombaire de la moelle épinière en modifiant les concentrations d'acide rétinoïque, de GDF et de FGF (**Fig. 2**) (Patani, 2016).

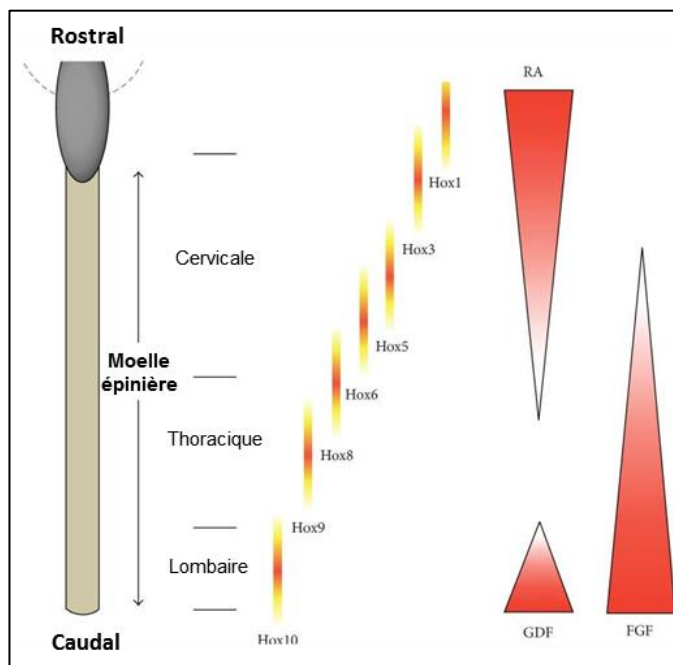


Figure 2 | Schéma représentant l'expression des gènes HOX le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière. Gradients d'expression (rouge/jaune) des gènes HOX le long de la moelle épinière. L'acide rétinoïque est responsable de la structuration de la partie cervicale. Les aires plus caudales sont structurées par l'action du FGF (fibroblast growth factor) et du GDF (growth differentiation factor). Patani, 2016; réimprimée avec la permission de *Stem Cells Int.* via la licence CC BY 4.0.

Il pourrait aussi être intéressant de générer des neurones du cortex moteur afin de voir si ces derniers sont atteints de la même façon que les MNs spinaux (Birger et al., 2018; Shi et al., 2012a). Quelques protocoles permettent de générer ces MNs primaires. *Gaspard et al.* ont d'abord montré l'importance de bloquer SHH pour obtenir une population homogène de neurones pyramidaux (Gaspard et al., 2008, 2009). *Shi et al.* ont eux montré que l'inhibition des SMADs et le contrôle de la concentration en vitamine A était cruciale pour cette différenciation (Shi et al., 2012a, 2012b). Pour *Espuny-Camacho et al.*, l'induction corticale ne nécessiterait pas de morphogène spécifique mais l'inactivation prolongée de la voie des BMPs (Espuny-Camacho et al., 2013). L'équipe de Diaz-Alonso a elle démontré l'importance de la modulation du récepteur cannabinoïde CB1 pour obtenir des neurones cortico-spinaux (Díaz-Alonso et al., 2012; Galve-Roperh et al., 2012).

Pour modéliser la SLA, seules deux études ont généré des neurones du cortex moteur à partir d'iPSC. *Burkhard et al.* ont montré que les neurones du cortex moteur dérivés de patients SLA, reconnus par le marquage CTIP2, pouvaient contenir des agrégats de la protéine TDP-43 intranucléaires similaires à ceux retrouvés dans les MNs spinaux (Burkhardt et al., 2013). *Selvaraj et al.* ont montré que la dérégulation des récepteurs AMPAR est spécifique des MNs spinaux car elle n'a pas été retrouvée dans des neurones corticaux marqués par Cux1 (Selvaraj et al., 2018). Si *Selvaraj et al.* a précisé que la culture de neurones corticaux contenait de la glie, aucun de ces deux papiers n'a indiqué la proportion de neurones corticaux obtenus (Burkhardt et al., 2013; Selvaraj et al., 2018).

2. LES AUTRES TYPES CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA SLA

Les modèles animaux ont permis de mettre en avant l'importance des cellules environnantes dans l'évolution de la pathologie telles que les astrocytes (Yamanaka et al., 2008) ou les oligodendrocytes (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Aussi, le fait que la diminution de la protéine mutée dans les cellules microgliales et macrophagiques ait pu augmenter la survie des souris SLA SOD1^{G37R} (Boillée et al., 2006) a suggéré une composante inflammatoire dans la pathogénicité de la SLA. L'activation des monocytes/macrophages est d'ailleurs plus élevée chez les patients sporadiques à un stade avancé de la pathologie (Zhang et al., 2009a) suggérant un rôle de l'inflammation centrale et périphérique au cours de la maladie. Ainsi, des protocoles établis pour générer ces différents types cellulaires permettraient donc de comprendre les mécanismes extrinsèques aux MNs impliqués dans la SLA (**Figure 3, Tableau 1**) (Guo et al., 2017b; Li et al., 2018; Zheng et al., 2018).

- Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du cerveau. Comme les neurones, il en existe plusieurs types qui se spécifient par des gradients de morphogènes et de facteurs de croissance. La revue de *Chandrasekaran et al.* compare et résume les différents protocoles publiés pour les générer (Chandrasekaran et al., 2016). Les astrocytes sont générés plus tardivement que les neurones lors du développement, ce qui implique des protocoles plus longs (entre 80 et 180 jours). Aujourd'hui, des protocoles nécessitent des améliorations afin d'augmenter la pureté, le contenu et l'efficacité de la différenciation astrocytaire (Li et al., 2018). *Serio et al.* ont généré des astrocytes à partir d'iPSC issues d'un individu atteints de SLA, porteur de la mutation *TARDBP*^{M337V}. Ils ont montré que les astrocytes mutants étaient plus vulnérables que les contrôles, mais ils n'ont pas observé d'effet toxique sur des neurones (Serio et al., 2013). Ces résultats sont différents de leur étude où des astrocytes de souris mutée SOD1^{G93A} exerçaient un effet toxique sur des MNs dérivés de cellules souches embryonnaires (Di Giorgio et al., 2008), suggérant que les cellules environnantes porteuses de différentes mutations n'ont peut-être pas les mêmes effets sur les MNs.

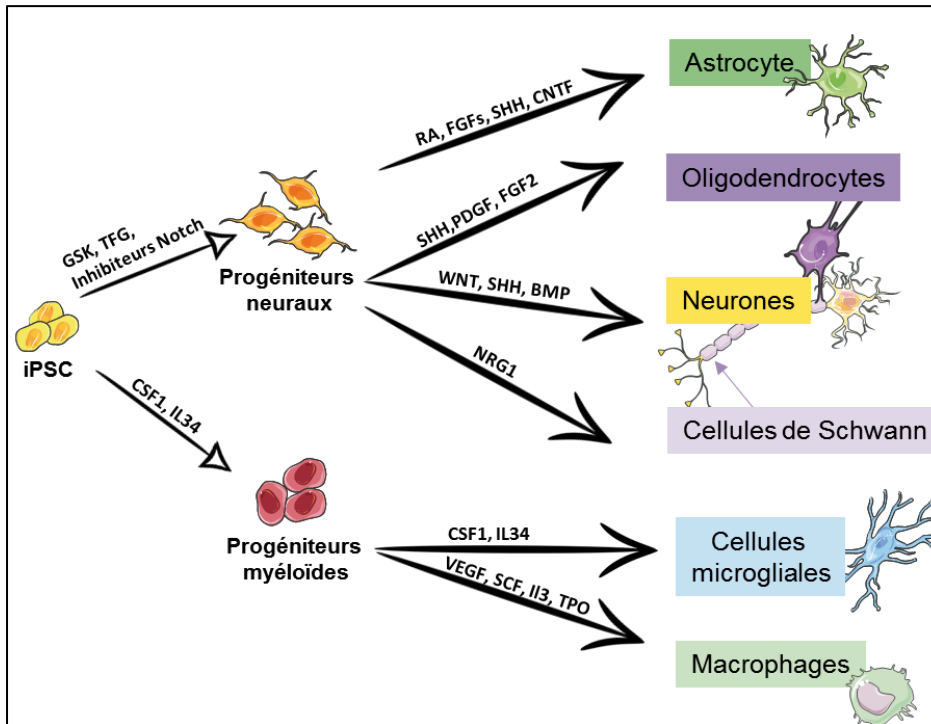


Figure 3 | Schéma représentant la différenciation des astrocytes, neurones, oligodendrocytes, cellules microgliales et macrophages à partir d'iPSC et exemples de molécules utilisées dans les protocoles. Les iPSC peuvent se différencier en progéniteurs neuraux qui ont la capacité de produire différents types cellulaires (astrocytes, neurones, oligodendrocytes) selon les morphogènes et/ou les facteurs de croissance qui les spécifient. Les cellules microgliales et les macrophages peuvent être différenciés à partir d'iPSC en passant par le stade de progéniteurs myéloïdes, bien que les cellules microgliales aient une origine développementale différente des macrophages (Adaptée de Li et al., 2018). Réalisée à partir d'images Servier Medical Art via la licence CC 3.0.

- Les oligodendrocytes forment et maintiennent la gaine de myéline qui entoure les MNs. Ces cellules proviennent de la zone ventriculaire du cerveau et de la moelle épinière sous l'influence de SHH durant les étapes précoces du développement (Li et al., 2018). Les progéniteurs d'oligodendrocytes proviennent aussi de progéniteurs neuraux. De ce fait, leur différenciation à partir d'iPSC requiert la formation de cellules neuroépithéliales. Ils sont spécifiés par l'action de l'acide rétinoïque, FGFs et SHH. En outre, PDGF permet d'améliorer leur expansion (Li et al., 2018). Cependant, leur maturation *in vitro* reste encore difficile.

- Les cellules de Schwann remplissent le rôle des oligodendrocytes à la périphérie mais très peu de protocoles existent pour les différencier à partir d'iPSC (Kim et al., 2017; Ziegler et al., 2011).

A ce jour, il n'existe pas de publication décrivant des oligodendrocytes et des cellules de Schwann dérivés d'iPSC de patients SLA. De même, il n'existe aucune étude concernant des macrophages ou des cellules microgliales dérivées d'iPSC issues d'individus atteints de SLA.

Le tableau ci-dessous présente l'origine de chaque type cellulaire (astrocytes, oligodendrocytes, cellules microgliales ou macrophages), certains de leurs marqueurs et différents protocoles publiés pour les générer.

Cellules	Origines	Marqueurs	Protocoles
Astrocytes	Ectoderme, Progéniteurs neuraux	- GFAP -S100β -GLT1	(Chandrasekaran et al., 2016; Emdad et al., 2012; Mormone et al., 2014; Roybon et al., 2013; Serio et al., 2013; Shaltouki et al., 2013; Zhou et al., 2016)
Oligodendrocytes	Ectoderme, Progéniteurs neuraux	-NG2 -MBP	(Douvaras et al., 2014; Ehrlich et al., 2017; Hu et al., 2009; Ogawa et al., 2011; Wang et al., 2013; Yamashita et al., 2017)
Cellules de Schwann	Ectoderme	-S100 -PMP22	(Kim et al., 2017; Ziegler et al., 2011)
Cellules microgliales	Mésoderme Sac vitellin	-IBA1 -CD11b -CD45 -P2RY12 -CX3CR1	(Abud et al., 2017; Douvaras et al., 2017; Haenseler et al., 2017; Muffat et al., 2016; Pandya et al., 2017)
Macrophages	Mésoderme Foie fœtal	-IBA1 -CD11b -CD45	(Gupta et al., 2016; Lachmann et al., 2015; Senju et al., 2009; Subramanian et al., 2009; van Wilgenburg et al., 2013; Yanagimachi et al., 2013)

Tableau 1 | Tableau présentant l'origine embryonnaire des astrocytes, oligodendrocytes, cellules de Schwann, cellules microgliales et macrophages, les marqueurs typiques de chaque type cellulaire et les protocoles publiés pour les générer à partir d'iPSC.

III. LA MORTALITE CELLULAIRE

Dans nos travaux, il n'a pas été mis en évidence de mortalité cellulaire, ce qui est en accord avec la plupart des études iPSC/SLA. Quelques publications ont quand même montré une diminution de la survie des MNs dérivés de patients SLA. *Bhinge et al.* ont observé une augmentation de la mort cellulaire en utilisant le même protocole que dans notre étude. Cependant, nos résultats ont été obtenus à une densité plus élevée et surtout en présence de nombreux NTFs (Bhinge et al., 2017). En effet, nous avons choisi d'utiliser un milieu riche pour pousser la maturation des MNs et favoriser leur survie à long terme. De nombreux essais cliniques les ont par ailleurs utilisés (Bianchi et al., 2017; Ekestern, 2004; Lamas et al., 2014).

Afin d'étudier si différents facteurs externes pourraient influencer la survie des MNs, j'ai mis en place un protocole impliquant une plateforme de criblage (Cell-insight) qui permet de détecter et compter automatiquement le nombre de cellules mortes en fonction de la taille et de l'intensité du marquage nucléaire. Le suivi de la totalité de la population cellulaire, comme cela a été fait dans

l'étude de *Bhingé et al.*, pourrait permettre de mettre en évidence une diminution de la survie en fonction de différents stress cellulaires appliqués aux MNs (Bhingé et al., 2017).

Alors que le soma ne semblait pas affecté malgré les accumulations de NFs, je me suis aussi posée la question de savoir si cela était le cas pour les axones. Afin d'y répondre, j'ai mis au point une macro sur Fiji afin de quantifier la dégénérescence en présence et en absence de NTFs. Elle consistait à mesurer l'aire des fragments de $\beta 3$ -tubuline sur l'aire totale (Vaur et al., 2017). Les premiers résultats ont indiqué que les neurites des MNs *SOD1* et *TARDBP* étaient plus fractionnés que les MNs contrôles (**Fig. 4**).

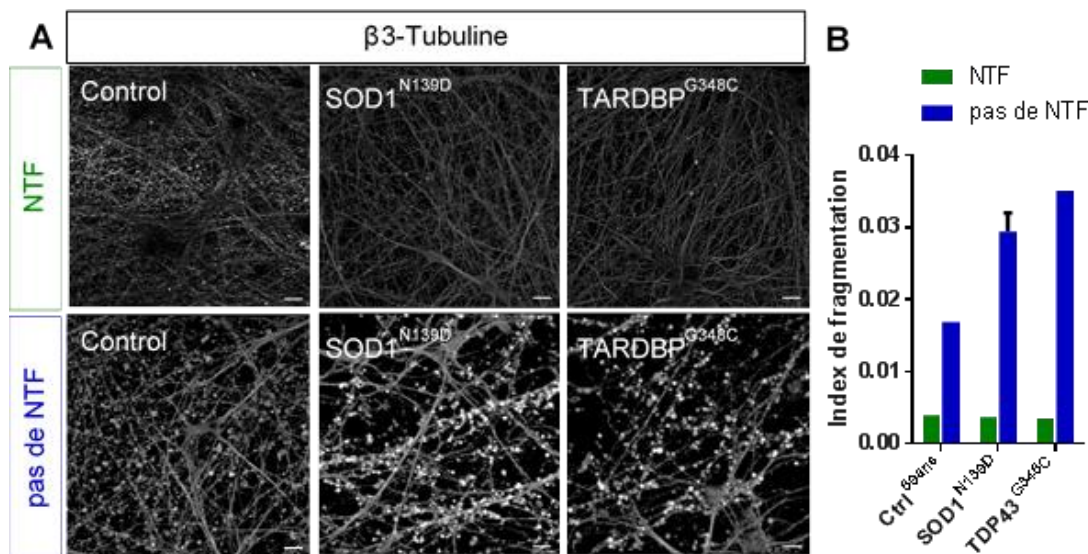


Figure 4 | Dégénérescence des neurites. (A) MNs marqués avec un anticorps anti- $\beta 3$ tubuline exposés avec ou sans facteurs neurotrophiques (NTF) lors de la maturation. Echelle = 10 μ m. (B) Indice de fragmentation de la $\beta 3$ tubuline des MNs contrôles ou SLA. Index de fragmentation est calculé en mesurant l'aire des fragments sur l'aire totale détectée par un seuil automatique (Fiji).

IV. IMPLEMENTER LA CULTURE DES MOTONEURONES EN MICROFLUIDIQUE

Il serait intéressant d'utiliser ces deux méthodes (Comptage nucléaire et Fragmentation axonale) pour quantifier la mortalité somatique et la dégénérescence axonale dans des circuits microfluidiques. En effet, le modèle de culture microfluidique permet aujourd'hui d'isoler plusieurs populations cellulaires et d'en orienter les connexions (Peyrin et al., 2011) (**Fig. 5A**). Une puce microfluidique est constituée par deux compartiments séparés par des canaux coniques dont l'ouverture de gauche est plus grande que l'ouverture de droite. L'asymétrie des canaux permet la croissance des axones des neurones ensemencés dans la chambre de gauche vers la chambre de droite et empêche la croissance neuritique des cellules ensemencées dans la chambre de droite vers la chambre de gauche.

Lors d'études préliminaires, j'ai pu adapter le protocole de différenciation des cellules iPSC dans ce système ce qui m'a permis d'isoler les somas des axones moteurs (**Fig. 5B-5D**).

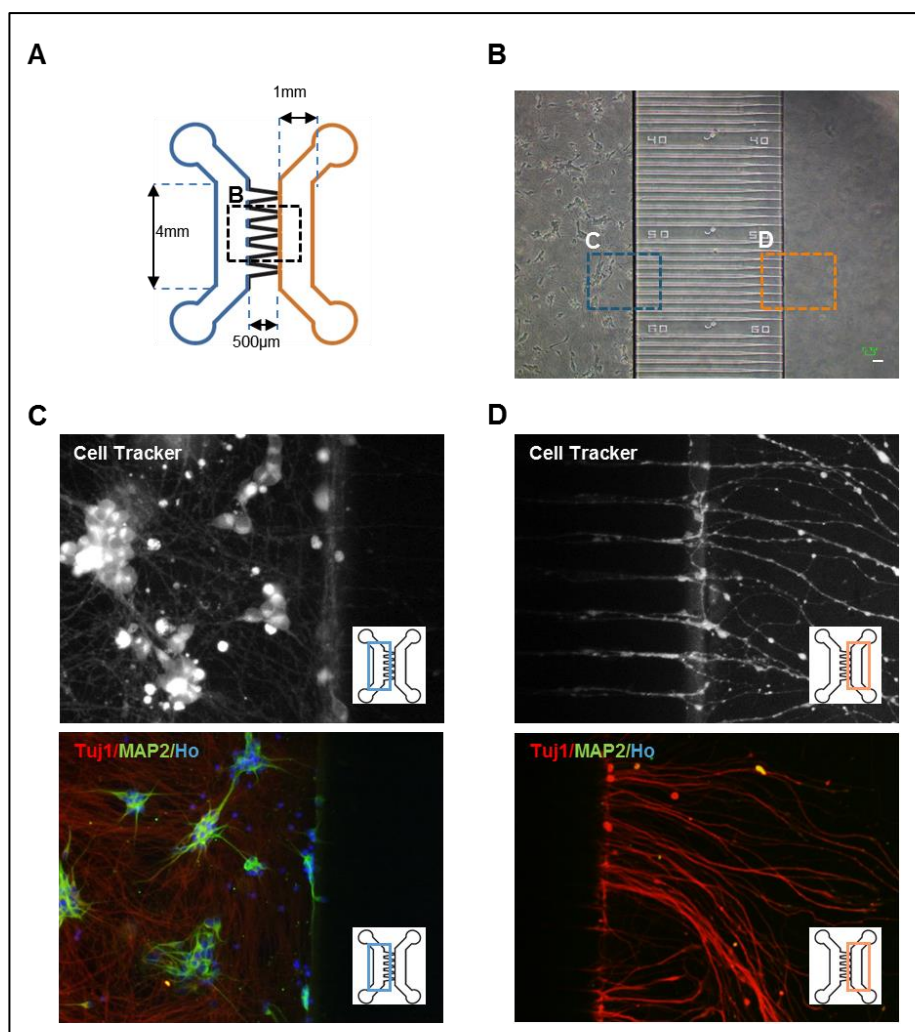


Figure 5 | MNs dérivés d'iPSC en culture microfluidique. (A) Schéma représentatif d'un circuit microfluidique. Un circuit est formé de deux chambres séparées par des micro-canaux asymétriques. Chaque chambre est un conduit ayant deux réservoirs aux extrémités. Des cellules peuvent être ensemencées dans la chambre de gauche (bleu) ou de droite (orange) au niveau de ces réservoirs. Les cellules vont alors se répartir avec le flux dans toute la chambre (Construction des puces, collaboration avec le Dr Jacotot, Paris). (B) MNs ensemencés dans la chambre de gauche en contraste de phase. Echelle = 30µm. (C-D) Soma (C, chambre de gauche) et axones (D, chambre de droite), marqués avec du CellTracker™ (1/10 000, C34565, Life technology) (*Haut*) ou marqués avec des anticorps anti-β3tubuline (Tuj1), anti-MAP2 et Hoescht (Ho) (*Bas*).

Plusieurs publications ont observé que les MNs étaient vulnérables en situation de stress (Bilican et al., 2012; Egawa et al., 2012; Ichiyanagi et al., 2016; Lenzi et al., 2015; Selvaraj et al., 2018). En implémentant la culture de MNs dans des puces microfluidiques, il serait possible de poser la question du *Dying-back* ou du *Dying-forward* des MNs spinaux. En effet, les différentes pressions fluidiques au sein de ce système permettent d'isoler strictement les deux compartiments pour les traiter séparément (Deleglise et al., 2013, 2014, 2018), par exemple, avec du glutamate ou de

l'H₂O₂ pour mimer un stress excitotoxique ou oxydatif respectivement (Egawa et al., 2012; Selvaraj et al., 2018).

Nous pourrions ainsi répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que l'ajout de glutamate sur les somas entraîne la dégénérescence des axones ?
- Est-ce que l'ajout du glutamate sur les axones est excitotoxique ?
- Est-il possible de restaurer les effets qui seront observés avec du Riluzole ?
- Le Riluzole agit-il sur les somas, les axones ou les deux compartiments ?

Cette technologie pourrait aussi permettre de répondre à plusieurs questions soulevées lors de ces travaux de thèse, telles que la dégénérescence axonale des MNs dérivés de SLA, la vulnérabilité des compartiments subcellulaires ainsi que la mise en place du réseau cortico-spinal et de la JNM. Ainsi, il serait possible de reproduire *in vitro* un réseau cortico-spinal unidirectionnel en ensemençant des neurones du cortex moteur dérivés d'iPSC à gauche et des MNs spinaux dans la chambre de droite. Ainsi, il serait possible d'étudier la vulnérabilité de ces deux types de neurones, leur synapses, avec ou sans stress.

De plus, parce qu'il est maintenant possible de générer des cellules musculaires striées squelettiques à partir d'iPSC (Shoji et al., 2015) nous pourrions reconstituer le réseau neuromusculaire *in vitro*. En collaboration avec le Dr Carnac (Université de Montpellier) qui différencie des cellules musculaires à partir de myoblastes de biopsies musculaires humaines, et l'équipe du Dr Jacotot (IBPS, Paris) qui fabrique les puces microfluidiques, j'ai pu mettre au point la différenciation de MNs et de myoblastes en culture microfluidique dans le but de montrer la génération de JNM. La **figure 6** montre que des axones de MNs ensemençés dans la chambre de gauche ont traversé vers la chambre de droite et sont au contact de cellules musculaires. Afin de

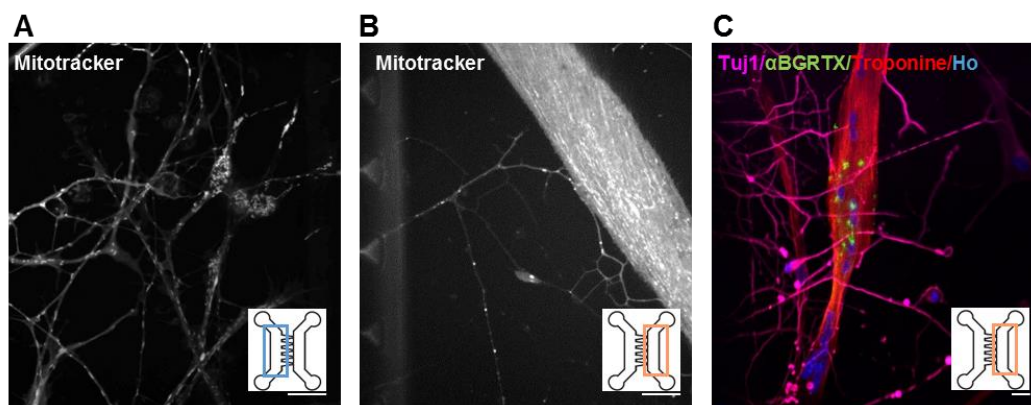


Figure 6 | Réseau neuromusculaire modélisé dans un circuit microfluidique. (A-B) Cellules marquées avec du MitoTracker™ CMXRos (M7512, Invitrogen). Les MNs dérivés d'iPSC ont été ensemençés dans la chambre de gauche (A) et des axones ont traversé dans la chambre de droite (B) où des cellules musculaires dérivées d'iPSC avaient été ensemençées. **(C)** Axones et cellules musculaires marqués avec un anticorps anti-β3tubuline (Tuj1), anti-αBungarotoxine (se fixe sur les récepteurs l'acétylcholine), anti-Troponine (protéine musculaire) et Hoescht (Ho). Echelles = 20µm.

valider la présence de JNM, il faudrait réaliser un co-marquage pré- (Synaptophysine) et post-synaptique (α -Bungarotoxine). Nous avons observé que les myotubes ne se disposaient pas en parallèle comme dans le muscle. Il faudrait donc optimiser ces cultures afin de forcer cette organisation pour améliorer la différenciation des cellules musculaires et donc, des JNMs.

Enfin, ces cultures compartimentalisées pourraient permettre d'étudier les interactions des MNs avec différents types cellulaires, comme des macrophages et des cellules microgliales, pour modéliser l'environnement de ces derniers *in vitro* et essayer de comprendre le rôle de chacun dans la dégénérescence du MNs.

V. AGREGATS PROTEIQUES ET ALTERATION DU SEGMENT INITIAL DE L'AXONE

Nous avons montré la présence d'agrégats de la protéine SOD1 dans les MNs porteurs de mutations *SOD1*, des *foci* d'ARNs dans les MNs mutants *C9ORF72* (Collaboration en cours) ainsi que de rares agrégats dans les MNs mutés au niveau du gène *TARDBP*. L'absence de délocalisation nucléaire de TDP-43 suggère un phénomène tardif dans la cascade de neurodégénérescence.

En outre, nous avons observé des accumulations de Cystatine C et/ou de NFs dans les MNs des quatre patients atteints de SLA. De façon intéressante, des accumulations de pNFs étaient localisées au niveau du cône d'émergence de l'axone et de la partie proximale de l'AIS.

L'AIS ayant un rôle clé au niveau de l'intégration des signaux et l'initiation des potentiels d'action ainsi qu'au niveau du maintien de l'intégrité axonale, nous nous sommes interrogés sur le lien entre les accumulations de NFs et une perturbation de l'AIS. Nos résultats montrent que l'intégrité de l'AIS est perturbée en présence des pNFs dans la région proximale. Mais est-il possible que l'AIS soit défectueux en l'absence d'accumulation ?

Nous n'avons pas pu répondre à cette question au niveau cellulaire. D'autres analyses sont à présent nécessaires. Néanmoins les analyses moléculaires en RNAseq le suggèrent puisque même sans accumulation nous avons pu mettre en évidence des défauts au niveau de l'AIS et de ses différents composants dans les MNs *TARDBP*.

Il faudrait ainsi étudier si le filtre moléculaire intracellulaire lié à la présence de l'AIS est maintenu dans les MNs dérivés d'iPSC de patients atteints de SLA. En effet, il a déjà été montré que ce rôle était perturbé dans d'autres contextes pathologiques (Buffington and Rasband, 2011; Huang and Rasband, 2018). Pour exemple, deux équipes ont montré des défauts de sélection au niveau du filtre créé par l'AIS. *Sun et al.* ont montré que NR2B (sous-unité du récepteur NMDA) était

anormalement localisée dans l'axone des cellules de l'hippocampe de souris Alzheimer (Sun et al., 2014), tandis que *Sohn et al.* ont montré que la protéine tau axonale était anormalement localisée au niveau du compartiment somato-dendritique (Sohn et al., 2016).

Afin de rechercher si le filtre moléculaire de l'AIS est perturbé dans les MNs SLA, nous pourrions micro-injecter des molécules de Dextran de divers poids moléculaires. De façon intéressante, nous avons mis en évidence par RNAseq, une dérégulation de la sous-unité NR2B dans les MNs dérivés de patients SLA (**Article 1, Table 2**). Comme *Sun et al.*, nous pourrions donc analyser si la localisation de ce récepteur est perturbée dans les MNs dérivés de patients. Cette expérience serait d'autant plus intéressante couplée à la culture en microfluidique, puisque si une délocalisation du récepteur NR2B est mise en évidence, elle pourrait être mise en relation avec les résultats obtenus lors d'un traitement excitotoxique puisque le glutamate est un agoniste du récepteur NMDA.

D'autre part, nous avons aussi observé une délocalisation de canaux Na⁺ voltage-dépendants (panNav). Il serait pertinent de suivre en en direct (*live imaging*) le regroupement de ces canaux à l'AIS ainsi que le transport de ces derniers. En collaboration avec le Dr Thétiot et le Dr Desmazières, nous avons commencé une expérience permettant de suivre la sous-unité $\beta 2$ des canaux Na⁺ voltage-dépendants, dont l'expression est dérégulée dans les MNs dérivés de patients SLA (**Article 1, Table 3**). Après transduction avec un vecteur lentiviral codant pour la sous-unité $\beta 2$ -Nav couplée à la protéine fluorescente mCherry sous le contrôle du promoteur synapsine, il a été possible de suivre le transport de ces sous-unités à l'AIS (**Fig. 7**). Néanmoins, il était difficile de localiser les parties proximales de l'axone. L'utilisation de cultures microfluidiques pourrait permettre de mieux analyser cette question.

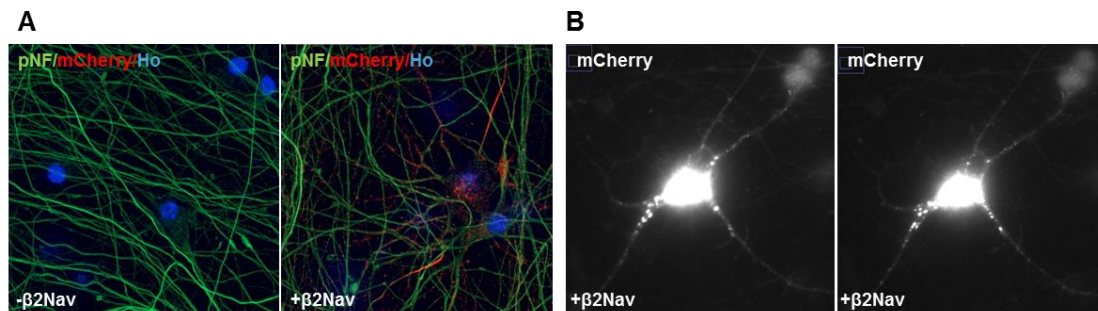


Figure 7 | MNs dérivés d'iPSC issues d'individus contrôles transduits avec un vecteur lentiviral codant pour la sous-unité $\beta 2$ des canaux sodiques voltage-dépendants couplée à la protéine fluorescente mCherry. A) Immunomarquage avec un anticorps dirigé contre pNFs et mCherry de cellules transfectées (droite) ou non (gauche) pour vérifier l'efficacité de la transduction. (Hoescht = Ho). B) Exemple d'acquisition en *live imaging* (à deux temps) d'un MNs transduit pour suivre le transport axonal des sous-unités.

Une hypothèse fort probable est que ces altérations au niveau de l'AIS pourraient conduire à une perturbation du transport axonal des organites. Des défauts du transport axonal ont été rapporté chez des souris SLA du stade pré-symptomatique (Gibbs et al., 2018). Il est clair que le transport est perturbé mais on ne sait pas la pathologie serait corrigée en restaurant uniquement le transport axonal (De Vos and Hafezparast, 2017). De façon intéressante, plusieurs gènes de transport associés à la SLA (comme *KIF5A* ou *DCTN1*) y sont directement liés, et dans notre étude, certains gènes codant pour des protéines motrices étaient dérégulés dans les MNs SLA par rapport aux MNs contrôles, dont des kinésines telles que *KIF5A* qui était surexprimée mais aussi des sous-unités de dynéines cytoplasmiques.

Seules deux publications ont étudié le transport axonal dans les MNs dérivés d'iPSC porteuses de mutations au niveau des gènes *TARDBP* et *FUS* (Alami et al., 2014; Guo et al., 2017a). Les travaux de *Guo et al.* (Collaboration) ont montré une dysfonction du transport mitochondrial dans les MNs mutés au niveau du gène *FUS*, restaurée par l'inhibition de HDAC6. Or, de façon intrigante, deux équipes ont montré que la perte d'HDAC6 perturbait l'AIS, notamment en modifiant la concentration des canaux sodiques et de l'AnkG, en altérant la distribution de kinésines le long de la cellule et en perturbant le déclenchement des potentiels d'action (Tapia et al., 2010; Tsushima et al., 2015)

Dans ces travaux de *Guo et al.* utilisant le même protocole que nous, ces anomalies ont été observées à T1, temps auquel nous avons observé les accumulations/ agrégats protéiques dans les autres types de SLA (*SOD1*, *C9ORF72*, *TARDBP*) et la perturbation de l'AIS. De plus, dans nos analyses entre T0 et T1 l'expression de HDAC6 était diminuée faisant écho aux résultats de *Tapia et al.* ainsi que *Tsushima et al.* faisant le lien entre la diminution de HDAC6 et l'altération de l'AIS.

Ainsi il sera intéressant de rechercher si les défauts de transport axonal observés peuvent être mis en relation avec un défaut de l'AIS dans les MNs *FUS*.

CHAPITRE 9 : CONCLUSION, QUAND LE DEVELOPPEMENT PERMET DE COMPRENDRE POUR SOIGNER LA DEGENERESCENCE

En 2012, le prix Nobel de Médecine est remis au Dr John Gurdon et au Dr Shinya Yamanaka pour avoir découvert que des cellules somatiques humaines pouvaient devenir pluripotentes sous l'action de quelques facteurs de transcriptions. En effet, leur découverte a ouvert tout un champ de recherche révolutionnant la biologie et la médecine. Parce que ces cellules appelées iPSC peuvent se différencier en n'importe quelle cellule de l'organisme, leur potentiel est phénoménal. Ces cellules permettent d'avoir accès à une source illimitée de cellules humaines, de modéliser des maladies dont les cellules sont défectueuses, d'en étudier les mécanismes, mais aussi de tester des molécules thérapeutiques tout en ouvrant la porte de la médecine régénérative.

Malgré les efforts de recherche translationnelle pour traiter la SLA, aucun traitement curatif n'est encore disponible. Cela pourrait s'expliquer par la difficulté de tester des molécules à potentiel thérapeutique. D'une part, parce qu'il n'est pas possible de réaliser des criblages de composés sur les modèles murins et que la plupart des essais effectués dans ces modèles sont réalisés au stade pré-symptomatique. D'autre part, parce que les criblages sur cellules sont rarement effectués sur des cellules humaines et encore moins sur des MNs humains.

La génération d'iPSC à partir de cellules somatiques a donné l'accès à des cellules jusque-là difficiles à étudier (ex : neurones). Comme les cellules souches embryonnaires humaines, les iPSCs permettent en théorie de générer par différenciation n'importe quelle cellule de l'organisme. Mais à la différence des cellules embryonnaires, limitées par des questions éthiques et par la modélisation de maladies génétiques, les iPSC permettent d'étudier les types cellulaires impliqués dans un contexte pathologique puisqu'elles peuvent être issues directement de n'importe quel individu, sain ou malade, qu'une cause génétique soit ou non connue.

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par la dégénérescence et la mortalité d'un type de neurone particulier. Beaucoup de protocoles ont déjà été publiés pour générer ces neurones (Corti et al., 2015), mais aussi diverses cellules du SNC et de la périphérie (astrocytes, oligodendrocytes, cellules microgliales, neurones, macrophages)(Li et al., 2018). Cela permet non seulement d'étudier le neurone qui dégénère, mais aussi d'étudier son environnement étiopathologique.

Toutefois, comme le souligne Corti et al., la plasticité des iPSC peut rendre difficile l'obtention d'une culture homogène de cellules différenciées et donc compliquer la compréhension des mécanismes pathologiques intrinsèques à chaque type et sous-type cellulaire (Corti et al., 2015). La grande quantité de protocoles existants pour générer des MNs illustre le besoin d'améliorer la pureté, la qualité, et le rendement des protocoles préalablement publiés (Sances et al., 2016). De ce fait, la majorité des travaux publiés à ce jour concernant des MNs SLA ont utilisé des protocoles différents,

ce qui rend de manière quasi impossible la comparaison des phénotypes observés entre chaque publication. De surcroît, peu d'entre elles comparent des MNs issus de patients ayant des formes distinctes de SLA. En conséquence, la mise en évidence de potentielles divergences mécanistiques impliquées dans la dégénérescence des MNs entre chaque patient est difficile.

Aujourd'hui, nous pouvons dire que ce travail de thèse a permis de répondre aux besoins et à la problématique soulevés, entre autres, par *Corti et al.*

- En appliquant un protocole de différenciation (Maury et al., 2015) stricte basé sur une utilisation et un choix rigoureux des clones d'iPSC à chaque différenciation et rythmé par des changements de milieu à des horaires bien définis, nous avons pu obtenir des populations homogènes de MNs dépourvues de cellules gliales de manière reproductible.

- En analysant au niveau immunocytochimique et transcriptomique les cultures obtenues, nous avons pu caractériser pour la première fois les cultures de MNs différenciées au sein de laquelle ont été comparés les MNs SLA et les MNs contrôles. Nous avons pu confirmer que tous les neurones générés étaient cholinergiques et que le type de MNs obtenu était typique des MNs spinaux de la LMC, MNs qui dégénèrent dans la SLA.

- En comparant les MNs issus de différents patients dans un même contexte expérimental, nous avons pu mettre en exergue des mécanismes physiopathologiques divergents et communs entre chaque MN issu de patients ayant une forme distincte de SLA.

S'il est vrai que l'ajout de nouveaux patients et de contrôles isogéniques à l'étude permettrait d'améliorer nos résultats, nous avons mis en place un protocole expérimental permettant de comparer efficacement différentes formes de SLA, afin de mettre en évidence des divergences ou des similitudes.

La découverte de mécanismes divergents entre des formes variées de SLA, et/ou l'étude des MNs dans des plateformes de criblage pourraient permettre de « hiérarchiser » les patients en fonction de la probabilité de répondre à un traitement pour diminuer le risque d'échec des essais cliniques. En effet, comme décrit dans l'introduction, la plupart des essais cliniques ciblent un seul mécanisme pathologique sur une population hétérogène de patients. La mise en place de la différenciation et l'analyse des MNs dans une plateforme de criblage (Cell-Insight) nous a permis (NVs) et nous permettra de tester de nouvelles molécules à potentiel thérapeutique de façon patient-spécifique puisque l'avantage des iPSC est de permettre l'étude au cas par cas. De cette façon, il sera possible de voir si certains MNs issus de patients répondent mieux à tel ou tel traitement (« essai clinique *in vitro* »), comme *Fujimori et al.* ont pu le montrer très récemment (Fujimori et al., 2018). Les iPSC peuvent aussi permettre d'accélérer la mise en place d'essais thérapeutiques comme le démontre les travaux de l'équipe du Dr Woolf et du Dr Wainger avec la Rétigabine (Wainger, 2015; Wainger et al., 2014). Pour rappel, son équipe avait montré un mécanisme commun à 3 formes de SLA : l'hyperexcitabilité des MNs qui était réduite en présence de rétigabine. D'autre part, la découverte de mécanismes communs et précoces entre des formes distinctes de SLA pourrait

aussi permettre de proposer de nouveaux biomarqueurs (comme CHL1 et CSTF), qui combinés à d'autres marqueurs pourraient être de nouveaux outils diagnostics et /ou pronostics.

Enfin, la différenciation des MNs dans des puces microfluidiques pourra permettre de mimer l'environnement cellulaire des MNs tel que la modélisation de la jonction musculaire ou du réseau cortico-spinal.

Pris dans leur ensemble, la méthodologie et les outils choisis et mis en place lors de cette thèse pourront permettre de mieux appréhender la SLA afin d'ouvrir la voie à une médecine plus personnalisée (**Fig. 8**) (Van Es et al., 2017).

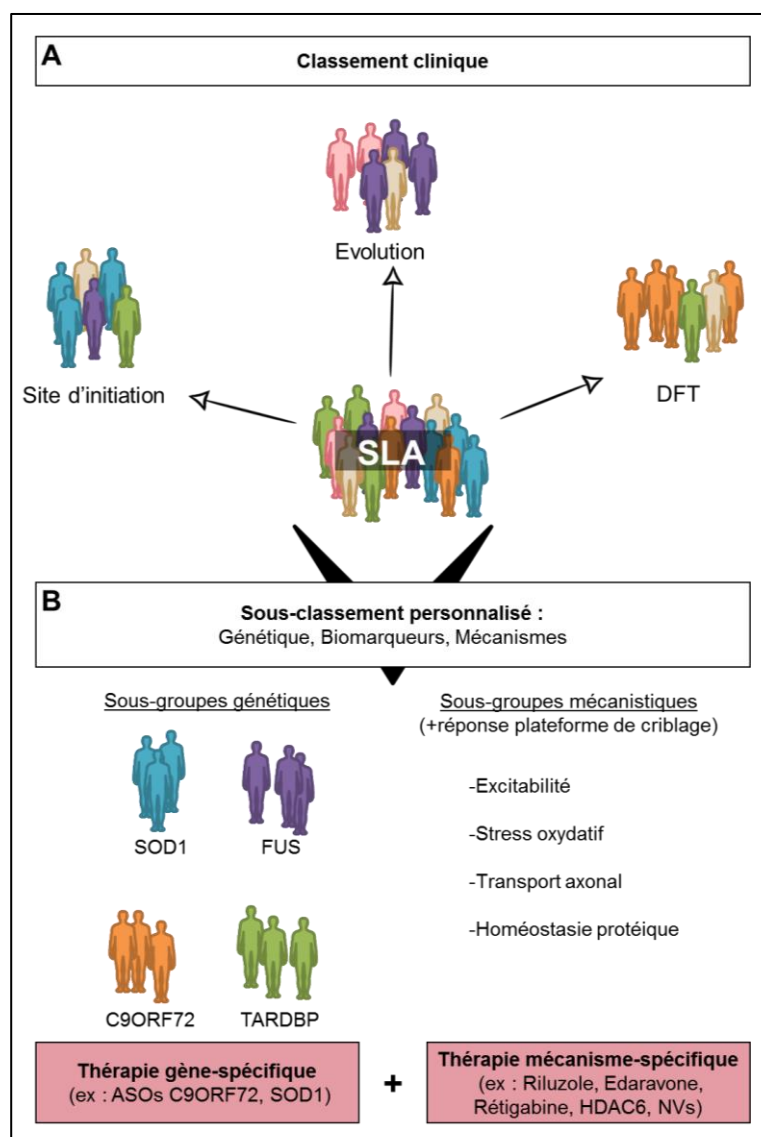


Figure 8 | Vers une médecine de précision.

La majorité des individus atteints de SLA sont inclus dans les essais cliniques sans pouvoir prendre en considération l'évolution, le site d'initiation, ou d'autres composantes cliniques (ex : DFT). De plus, la grande majorité des essais cliniques ne ciblent qu'un seul patho-mécanisme (cf. Chapitre 5).

Or, les données suggérant que la SLA est plus un syndrome qu'une maladie, il serait pertinent de traiter les sous-populations de patients différemment en prenant compte des différences cliniques (**A**) mais aussi en prenant compte d'autres paramètres (**B**) tels que la génétique, les biomarqueurs ou les mécanismes impliqués dans la dégénérescence de « leurs » MNs qui pourraient permettre d'identifier des populations plus homogènes et des thérapies plus adaptées.

La diversité des mécanismes impliqués dans la pathogénicité de la SLA suggère qu'un traitement à base d'un cocktail de composés ciblant divers mécanismes serait plus satisfaisant, pour des patients qui à l'heure actuelle ne peuvent être traités qu'une fois la maladie est déjà déclarée.

(Inspirée de Van Es et al., 2017)

BIBLIOGRAPHIE

Abdulla, S., Machts, J., Kaufmann, J., Patrick, K., Kollwe, K., Dengler, R., Heinze, H.-J., Petri, S., Vielhaber, S., and Nestor, P.J. (2014). Hippocampal degeneration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* 35, 2639–2645.

Abe, K., Fujimura, H., Toyooka, K., Sakoda, S., Yorifuji, S., and Yanagihara, T. (1997). Cognitive function in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 148, 95–100.

Abernathy, D.G., Kim, W.K., McCoy, M.J., Lake, A.M., Ouwenga, R., Lee, S.W., Xing, X., Li, D., Lee, H.J., Heuckeroth, R.O., et al. (2017). MicroRNAs Induce a Permissive Chromatin Environment that Enables Neuronal Subtype-Specific Reprogramming of Adult Human Fibroblasts. *Cell Stem Cell* 21, 332–348.e9.

Abud, E.M., Ramirez, R.N., Martinez, E.S., Healy, L.M., Nguyen, C.H.H., Newman, S.A., Yeromin, A.V., Scarfone, V.M., Marsh, S.E., Fimbres, C., et al. (2017). iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases. *Neuron* 94, 278–293.e9.

Ackerley, S., Grierson, A.J., Banner, S., Perikinton, M.S., Brownlees, J., Byers, H.L., Ward, M., Thornhill, P., Hussain, K., Waby, J.S., et al. (2004). p38alpha stress-activated protein kinase phosphorylates neurofilaments and is associated with neurofilament pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 354–364.

Akiyama, T., Warita, H., Kato, M., Nishiyama, A., Izumi, R., Ikeda, C., Kamada, M., Suzuki, N., and Aoki, M. (2016). Genotype-phenotype relationships in familial amyotrophic lateral sclerosis with FUS/TLS mutations in Japan. *Muscle Nerve* 54, 398–404.

Alami, N.H., Smith, R.B., Carrasco, M.A., Williams, L.A., Winborn, C.S., Han, S.S.W., Kiskinis, E., Winborn, B., Freibaum, B.D., Kanagaraj, A., et al. (2014). Axonal Transport of TDP-43 mRNA Granules Is Impaired by ALS-Causing Mutations. *Neuron* 81, 536–543.

Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Nilsson, P., Chioza, B., Andersson, J.L., Russ, C., Shaw, C.E., Powell, J.F., and Leigh, P.N. (1999). Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 8, 157–164.

Al-Chalabi, A., Fang, F., Hanby, M.F., Leigh, P.N., Shaw, C.E., Ye, W., and Rijdsdijk, F. (2010). An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 1324–1326.

Al-Chalabi, A., Jones, A., Troakes, C., King, A., Al-Sarraj, S., and van den Berg, L.H. (2012a). The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 339–352.

Al-Chalabi, A., Jones, A., Troakes, C., King, A., Al-Sarraj, S., and Berg, L.H. van den (2012b). The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 339–352.

Alexander, M.D., Traynor, B.J., Miller, N., Corr, B., Frost, E., McQuaid, S., Brett, F.M., Green, A., and Hardiman, O. (2002). ?True? sporadic ALS associated with a novel SOD-1 mutation. *Ann. Neurol.* 52, 680–683.

Allan, D.W., and Greer, J.J. (1997). Embryogenesis of the phrenic nerve and diaphragm in the fetal rat. *J. Comp. Neurol.* 382, 459–468.

Allen, G.I., and Tsukahara, N. (1974). Cerebrocerebellar communication systems. *Physiol. Rev.* 54, 957–1006.

- Allodi, I., and Hedlund, E. (2014). Directed midbrain and spinal cord neurogenesis from pluripotent stem cells to model development and disease in a dish. *Front. Neurosci.* 8.
- Alves, C.J., Dariolli, R., Jorge, F.M., Monteiro, M.R., Maximino, J.R., Martins, R.S., Strauss, B.E., Krieger, J.E., Callegaro, D., and Chadi, G. (2015). Gene expression profiling for human iPS-derived motor neurons from sporadic ALS patients reveals a strong association between mitochondrial functions and neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 9.
- Aman, P., Panagopoulos, I., Lassen, C., Fioretos, T., Mencinger, M., Toresson, H., Höglund, M., Forster, A., Rabbitts, T.H., Ron, D., et al. (1996). Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics* 37, 1–8.
- Amick, J., Roczniak-Ferguson, A., and Ferguson, S.M. (2016). C9orf72 binds SMCR8, localizes to lysosomes, and regulates mTORC1 signaling. *Mol. Biol. Cell* 27, 3040–3051.
- Amirzargar, N., Nafissi, S., Tafakhori, A., Modabbernia, A., Amirzargar, A., Ghaffarpour, M., Siroos, B., and Harirchian, M.H. (2015). Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Iranian Patients. *J. Clin. Neurol. Seoul Korea* 11, 164–171.
- Amoroso, M.W., Croft, G.F., Williams, D.J., O’Keeffe, S., Carrasco, M.A., Davis, A.R., Roybon, L., Oakley, D.H., Maniatis, T., Henderson, C.E., et al. (2013). Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 574–586.
- Andersen, P.M., Nilsson, P., Ala-Hurula, V., Keränen, M.L., Tarvainen, I., Haltia, T., Nilsson, L., Binzer, M., Forsgren, L., and Marklund, S.L. (1995). Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 10, 61–66.
- Andrews, Z.B., Diano, S., and Horvath, T.L. (2005). Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 829–840.
- Antony-Debré, I., Hamidi, S., Norol, F., Vainchenker, W., and Raslova, H. (2013). Induced pluripotent stem cells: from history to applications. *Hématologie* 20–32.
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., et al. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 602–611.
- Arber, S. (2008). FoxP1: conducting the Hox symphony in spinal motor neurons.
- Arber, S. (2012). Motor Circuits in Action: Specification, Connectivity, and Function. *Neuron* 74, 975–989.
- Arber, S., Han, B., Mendelsohn, M., Smith, M., Jessell, T.M., and Sockanathan, S. (1999). Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* 23, 659–674.
- Arnold, E.S., Ling, S.-C., Huelga, S.C., Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Ditsworth, D., Kordasiewicz, H.B., McAlonis-Downes, M., Platoshyn, O., Parone, P.A., et al. (2013). ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E736-745.
- Ash, P.E.A., Bieniek, K.F., Gendron, T.F., Caulfield, T., Lin, W.-L., DeJesus-Hernandez, M., van Blitterswijk, M.M., Jansen-West, K., Paul, J.W., Rademakers, R., et al. (2013). Unconventional Translation of C9ORF72 GGGGCC Expansion Generates Insoluble Polypeptides Specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77, 639–646.
- Ashraf, A., Clark, M., and So, P.-W. (2018). The Aging of Iron Man. *Front. Aging Neurosci.* 10, 65.

- Atanasio, A., Decman, V., White, D., Ramos, M., Ikiz, B., Lee, H.-C., Siao, C.-J., Brydges, S., LaRosa, E., Bai, Y., et al. (2016). C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production, and glomerulonephropathy in mice. *Sci. Rep.* *6*, 23204.
- Atkin, J.D., Farg, M.A., Walker, A.K., McLean, C., Tomas, D., and Horne, M.K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* *30*, 400–407.
- Attisano, L., and Tuen Lee-Hoeflich, S. (2001). The Smads. *Genome Biol.* *2*, reviews3010.1-reviews3010.8.
- Augustine, E.F., Adams, H.R., and Mink, J.W. (2013). Clinical Trials in Rare Disease: Challenges and Opportunities. *J. Child Neurol.* *28*, 1142–1150.
- Ayala, Y.M., Misteli, T., and Baralle, F.E. (2008a). TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3785–3789.
- Ayala, Y.M., Misteli, T., and Baralle, F.E. (2008b). TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 3785–3789.
- Ayala, Y.M., Zago, P., D'Ambrogio, A., Xu, Y.-F., Petrucelli, L., Buratti, E., and Baralle, F.E. (2008c). Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J. Cell Sci.* *121*, 3778–3785.
- Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chausseot, A., Genin, E.C., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., Berg-Alonso, L., Kageyama, Y., Serre, V., Moore, D.G., et al. (2014). A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain* *137*, 2329–2345.
- Bell, C., and University College, L.L.S. (1830). *The nervous system of the human body. Embracing the papers delivered to the Royal Society on the subject of the nerves* (London : Longman,Rees,Orme,Brown & Green).
- Bellingham, M.C. (2011). A Review of the Neural Mechanisms of Action and Clinical Efficiency of Riluzole in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis: What have we Learned in the Last Decade? *CNS Neurosci. Ther.* *17*, 4–31.
- Belzil, V.V., Langlais, J.-S., Daoud, H., Dion, P.A., Brais, B., and Rouleau, G.A. (2012). Novel FUS deletion in a patient with juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* *69*, 653–656.
- Benajiba, L., Le Ber, I., Camuzat, A., Lacoste, M., Thomas-Anterion, C., Couratier, P., Legallic, S., Salachas, F., Hannequin, D., Decousus, M., et al. (2009). TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Ann. Neurol.* *65*, 470–473.
- Benatar, M., Boylan, K., Jeromin, A., Rutkove, S.B., Berry, J., Atassi, N., and Bruijn, L. (2016). ALS Biomarkers for Therapy Development: State of the Field & Future Directions. *Muscle Nerve* *53*, 169–182.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N. Engl. J. Med.* *330*, 585–591.
- Bentmann, E., Haass, C., and Dormann, D. (2013). Stress granules in neurodegeneration-- lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J.* *280*, 4348–4370.

- Berry, J.D., Paganoni, S., Atassi, N., Macklin, E.A., Goyal, N., Rivner, M., Simpson, E., Appel, S., Grasso, D.L., Mejia, N.I., et al. (2017). Phase IIa trial of fingolimod for amyotrophic lateral sclerosis demonstrates acceptable acute safety and tolerability. *Muscle Nerve* 56, 1077–1084.
- Bettencourt, C., and Houlden, H. (2015). Exome sequencing uncovers hidden pathways in familial and sporadic ALS. *Nat. Neurosci.* 18, 611.
- Bhinge, A., Namboori, S.C., Zhang, X., VanDongen, A.M.J., and Stanton, L.W. (2017). Genetic Correction of SOD1 Mutant iPSCs Reveals ERK and JNK Activated AP1 as a Driver of Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Stem Cell Rep.* 8, 856–869.
- Bianchi, V.E., Locatelli, V., and Rizzi, L. (2017). Neurotrophic and Neuroregenerative Effects of GH/IGF1. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Bilican, B., Serio, A., Barmada, S.J., Nishimura, A.L., Sullivan, G.J., Carrasco, M., Phatnani, H.P., Puddifoot, C.A., Story, D., Fletcher, J., et al. (2012). Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 5803–5808.
- Bilsland, L.G., Sahai, E., Kelly, G., Golding, M., Greensmith, L., and Schiavo, G. (2010). Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20523–20528.
- Birger, A., Ottolenghi, M., Perez, L., Reubinoff, B., and Behar, O. (2018). ALS-related human cortical and motor neurons survival is differentially affected by Sema3A. *Cell Death Dis.* 9, 256.
- Blair, I.P., Williams, K.L., Warraich, S.T., Durnall, J.C., Thoeng, A.D., Manavis, J., Blumbergs, P.C., Vucic, S., Kiernan, M.C., and Nicholson, G.A. (2010). FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 639–645.
- Blasco, H., Corcia, P., and Pradat, P.-F. (2014). L'utilisation de biomarqueurs dans la SLA est-elle d'actualité ? *Presse Médicale* 43, 569–579.
- Blizzard, C.A., Southam, K.A., Dawkins, E., Lewis, K.E., King, A.E., Clark, J.A., and Dickson, T.C. (2015). Identifying the primary site of pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis – vulnerability of lower motor neurons to proximal excitotoxicity. *Dis. Model. Mech.* 8, 215–224.
- Blokhuis, A.M., Groen, E.J.N., Koppers, M., van den Berg, L.H., and Pasterkamp, R.J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 777–794.
- Bohl, D., Pochet, R., Mitrecic, D., and Nicaise, C. (2016). Modelling and treating amyotrophic lateral sclerosis through induced-pluripotent stem cells technology. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 11, 301–312.
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389–1392.
- Bonifacino, T., Musazzi, L., Milanese, M., Seguíni, M., Marte, A., Gallia, E., Cattaneo, L., Onofri, F., Popoli, M., and Bonanno, G. (2016). Altered mechanisms underlying the abnormal glutamate release in amyotrophic lateral sclerosis at a pre-symptomatic stage of the disease. *Neurobiol. Dis.* 95, 122–133.
- Borghese, L., Dolezalova, D., Opitz, T., Haupt, S., Leinhaas, A., Steinfarz, B., Koch, P., Edenhofer, F., Hampl, A., and Brüstle, O. (2010). Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 955–964.

- Bories, C., Amendola, J., Lamotte d'Incamps, B., and Durand, J. (2007). Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 25, 451–459.
- Borooh, S., Phillips, M.J., Bilican, B., Wright, A.F., Wilmut, I., Chandran, S., Gamm, D., and Dhillon, B. (2013). Using human induced pluripotent stem cells to treat retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 37, 163–181.
- Bostock, H., Sharief, M.K., Reid, G., and Murray, N.M. (1995). Axonal ion channel dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J. Neurol.* 118 (Pt 1), 217–225.
- Boulting, G.L., Kiskinis, E., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., Wainger, B.J., Williams, D.J., Kahler, D.J., Yamaki, M., Davidow, L., et al. (2011). A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 279–286.
- Boyault, C., and Khochbin, S. (2008). HDAC6, chef d'orchestre de la défense anti-agrégats protéiques. *Médecine/Sciences* 24, 15–17.
- Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M., and Khochbin, S. (2007). HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene* 26, 5468–5476.
- Braissant, O. (2007). Neurofilament Proteins in Brain Diseases. 27.
- Braun, A.T., Caballero-Eraso, C., and Lechtzin, N. (2018). Amyotrophic Lateral Sclerosis and the Respiratory System. *Clin. Chest Med.* 39, 391–400.
- Brenner, D., Müller, K., Wieland, T., Weydt, P., Böhm, S., Lulé, D., Hübers, A., Neuwirth, C., Weber, M., Borck, G., et al. (2016). *NEK1* mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 139, e28–e28.
- Brenner, D., Yilmaz, R., Müller, K., Grehl, T., Petri, S., Meyer, T., Grosskreutz, J., Weydt, P., Ruf, W., Neuwirth, C., et al. (2018). Hot-spot KIF5A mutations cause familial ALS. *Brain* 141, 688–697.
- Brichta, A.M., Callister, R.J., and Peterson, E.H. (1987). Quantitative analysis of cervical musculature in rats: Histochemical composition and motor pool organization. I. Muscles of the spinal accessory complex. *J. Comp. Neurol.* 255, 351–368.
- Brockington, A., Ning, K., Heath, P.R., Wood, E., Kirby, J., Fusi, N., Lawrence, N., Wharton, S.B., Ince, P.G., and Shaw, P.J. (2013). Unravelling the enigma of selective vulnerability in neurodegeneration: motor neurons resistant to degeneration in ALS show distinct gene expression characteristics and decreased susceptibility to excitotoxicity. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 95–109.
- Brooks, B.R. (1994a). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 124, 96–107.
- Brooks, B.R. (1994b). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial “Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis” workshop contributors. *J. Neurol. Sci.* 124 Suppl, 96–107.
- Brooks, c, Miller, R.G., Swash, M., and Munsat, T.L. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 1, 293–299.
- Brown, R.H., and Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 377, 162–172.

- Brunet, A., Datta, S.R., and Greenberg, M.E. (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* *11*, 297–305.
- Budini, M., Buratti, E., Stuani, C., Guarnaccia, C., Romano, V., De Conti, L., and Baralle, F.E. (2012). Cellular Model of TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) Aggregation Based on Its C-terminal Gln/Asn-rich Region. *J. Biol. Chem.* *287*, 7512–7525.
- Buffington, S.A., and Rasband, M.N. (2011). The axon initial segment in nervous system disease and injury. *Eur. J. Neurosci.* *34*, 1609–1619.
- Buhusi, M., Midkiff, B.R., Gates, A.M., Richter, M., Schachner, M., and Maness, P.F. (2003). Close homolog of L1 is an enhancer of integrin-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.* *278*, 25024–25031.
- Bunina, T.L. (1962). [On intracellular inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis]. *Zhurnal Nevropatol. Psikiatrii Im. SS Korsakova Mosc. Russ.* *1952* *62*, 1293–1299.
- Buratti, E., and Baralle, F.E. (2001). Characterization and Functional Implications of the RNA Binding Properties of Nuclear Factor TDP-43, a Novel Splicing Regulator of CFTR Exon 9. *J. Biol. Chem.* *276*, 36337–36343.
- Buratti, E., Dörk, T., Zuccato, E., Pagani, F., Romano, M., and Baralle, F.E. (2001). Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J.* *20*, 1774–1784.
- Burkhardt, M.F., Martinez, F.J., Wright, S., Ramos, C., Volfson, D., Mason, M., Garnes, J., Dang, V., Lievers, J., Shoukat-Mumtaz, U., et al. (2013). A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *56*, 355–364.
- Caligari, M., Godi, M., Guglielmetti, S., Franchignoni, F., and Nardone, A. (2013). Eye tracking communication devices in amyotrophic lateral sclerosis: Impact on disability and quality of life. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* *14*, 546–552.
- Campbell, M. (2000). Framework for design and evaluation of complex interventions to improve health. *BMJ* *321*, 694–696.
- Campos-Melo, D., Droppelmann, C.A., He, Z., Volkening, K., and Strong, M.J. (2013). Altered microRNA expression profile in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a role in the regulation of NFL mRNA levels. *Mol. Brain* *6*, 26.
- Campos-Melo, D., Droppelmann, C.A., Volkening, K., and Strong, M.J. (2014). RNA-binding proteins as molecular links between cancer and neurodegeneration. *Biogerontology* *15*, 587–610.
- Carpenter, S. (1968). Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology* *18*, 841–851.
- de Carvalho, M., Pinto, S., Costa, J., Evangelista, T., Ohana, B., and Pinto, A. (2010). A randomized, placebo-controlled trial of memantine for functional disability in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* *11*, 456–460.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* *27*, 275–280.
- Chance, P.F., Rabin, B.A., Ryan, S.G., Ding, Y., Scavina, M., Crain, B., Griffin, J.W., and Cornblath, D.R. (1998). Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 633–640.

- Chandrasekaran, A., Avci, H.X., Leist, M., Kobilák, J., and Dinnyés, A. (2016). Astrocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: New Tools for Neurological Disorder Research. *Front. Cell. Neurosci.* 10.
- Chen, H., Qian, K., Du, Z., Cao, J., Petersen, A., Liu, H., Blackbourn, L.W., Huang, C.-L., Errigo, A., Yin, Y., et al. (2014). Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell* 14, 796–809.
- Chen, S., Sayana, P., Zhang, X., and Le, W. (2013). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol. Neurodegener.* 8, 28.
- Chen, S., Zhang, X.-J., Li, L.-X., Wang, Y., Zhong, R.-J., and Le, W. (2015). Histone deacetylase 6 delays motor neuron degeneration by ameliorating the autophagic flux defect in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Bull.* 31, 459–468.
- Chen, X., Fan, Z., McGee, W., Chen, M., Kong, R., Wen, P., Xiao, T., Chen, X., Liu, J., Zhu, L., et al. (2017). TDP-43 regulates cancer-associated microRNAs. *Protein Cell.*
- Cheney, P.D. (1985). Role of cerebral cortex in voluntary movements: A review. *Phys. Ther.* 65, 624–635.
- Chew, J., Gendron, T.F., Prudencio, M., Sasaguri, H., Zhang, Y.-J., Castanedes-Casey, M., Lee, C.W., Jansen-West, K., Kurti, A., Murray, M.E., et al. (2015). C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science* 348, 1151–1154.
- Chiang, C.-H., Grauffel, C., Wu, L.-S., Kuo, P.-H., Doudeva, L.G., Lim, C., Shen, C.-K.J., and Yuan, H.S. (2016). Structural analysis of disease-related TDP-43 D169G mutation: linking enhanced stability and caspase cleavage efficiency to protein accumulation. *Sci. Rep.* 6.
- Chiò, A., Benzi, G., Dossena, M., Mutani, R., and Mora, G. (2005). Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain J. Neurol.* 128, 472–476.
- Chio, A., Logroscino, G., Hardiman, O., Swingler, R., Mitchell, D., Beghi, E., and Traynor, B.G. (2009). Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 10, 310–323.
- Chiò, A., Calvo, A., Moglia, C., Mazzini, L., Mora, G., and PARALS study group (2011). Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 82, 740–746.
- Chiò, A., Calvo, A., Mazzini, L., Cantello, R., Mora, G., Moglia, C., Corrado, L., D'alfonso, S., Majounie, E., Renton, A., et al. (2012). Extensive genetics of ALS A population-based study in Italy. *Neurology* 79, 1983–1989.
- Chiò, A., Brunetti, M., Barberis, M., Iazzolino, B., Montuschi, A., Ilardi, A., Cammarosano, S., Canosa, A., Moglia, C., and Calvo, A. (2016). The Role of APOE in the Occurrence of Frontotemporal Dementia in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 73, 425–430.
- Cho, J.-H., and Johnson, G.V.W. (2004). Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J. Neurochem.* 88, 349–358.
- Chow, C.Y., Landers, J.E., Bergren, S.K., Sapp, P.C., Grant, A.E., Jones, J.M., Everett, L., Lenk, G.M., McKenna-Yasek, D.M., Weisman, L.S., et al. (2009). Deleterious Variants of FIG4, a Phosphoinositide Phosphatase, in Patients with ALS. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 85–88.
- Chuang, J.-H., Tung, L.-C., and Lin, Y. (2015). Neural differentiation from embryonic stem cells in vitro: An overview of the signaling pathways. *World J. Stem Cells* 7, 437–447.

Coget, J. (2009). *PHYSIOLOGIE DU NEURONE - Le potentiel d'action*.

Cohen, T.J., Lee, V.M.Y., and Trojanowski, J.Q. (2011). TDP-43 functions and pathogenic mechanisms implicated in TDP-43 proteinopathies. *Trends Mol. Med.* 17, 659–667.

Comley, L., Allodi, I., Nichterwitz, S., Nizzardo, M., Simone, C., Corti, S., and Hedlund, E. (2015). Motor neurons with differential vulnerability to degeneration show distinct protein signatures in health and ALS. *Neuroscience* 291, 216–229.

Conte, A., Lattante, S., Zollino, M., Marangi, G., Luigetti, M., Del Grande, A., Servidei, S., Trombetta, F., and Sabatelli, M. (2012). P525L FUS mutation is consistently associated with a severe form of juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuromuscul. Disord.* 22, 73–75.

Corcia, P., Valdmanis, P., Millicamps, S., Lionnet, C., Blasco, H., Mouzat, K., Daoud, H., Belzil, V., Morales, R., and Pageot, N. (2012). Phenotype and genotype analysis in amyotrophic lateral sclerosis with TARDBP gene mutations. *Neurology* 78, 1519–1526.

Corrado, L., Carlomagno, Y., Falasco, L., Mellone, S., Godi, M., Cova, E., Cereda, C., Testa, L., Mazzini, L., and D'Alfonso, S. (2011). A novel peripherin gene (PRPH) mutation identified in one sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient. *Neurobiol. Aging* 32, 552.e1-6.

Corti, S., Faravelli, I., Cardano, M., and Conti, L. (2015). Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 10, 615–629.

Costa, J., and de Carvalho, M. (2016). Emerging molecular biomarker targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Chim. Acta* 455, 7–14.

Côté, F., Collard, J.F., and Julien, J.P. (1993). Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 73, 35–46.

Couillard-Després, S., Zhu, Q., Wong, P.C., Price, D.L., Cleveland, D.W., and Julien, J.-P. (1998). Protective effect of neurofilament heavy gene overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 9626–9630.

Couratier, P., Marin, B., Lautrette, G., Nicol, M., and Preux, P.-M. (2014). Épidémiologie, spectre clinique de la SLA et diagnostics différentiels. *Presse Médicale* 43, 538–548.

Crozat, A., Aman, P., Mandahl, N., and Ron, D. (1993). Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* 363, 640–644.

Cudkovicz, M.E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.E., Chin, W., Geller, B., Hayden, D.L., Schoenfeld, D.A., Hosler, B.A., Horvitz, H.R., and Brown, R.H. (1997). Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 41, 210–221.

Cudkovicz, M.E., Shefner, J.M., Schoenfeld, D.A., Zhang, H., Andreasson, K.I., Rothstein, J.D., and Drachman, D.B. (2006). Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 60, 22–31.

Cudkovicz, M.E., Andres, P.L., Macdonald, S.A., Bedlack, R.S., Choudry, R., Brown, R.H., Zhang, H., Schoenfeld, D.A., Shefner, J., Matson, S., et al. (2009). Phase 2 study of sodium phenylbutyrate in ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 10, 99–106.

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

Cudkowicz, M.E., Titus, S., Kearney, M., Yu, H., Sherman, A., Schoenfeld, D., Hayden, D., Shui, A., Brooks, B., Conwit, R., et al. (2014). Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* *13*, 1083–1091.

Dadon-Nachum, M., Melamed, E., and Offen, D. (2011). The “Dying-Back” Phenomenon of Motor Neurons in ALS. *J. Mol. Neurosci.* *43*, 470–477.

Dafinca, R., Scaber, J., Ababneh, N., Lalic, T., Weir, G., Christian, H., Vowles, J., Douglas, A.G.L., Fletcher-Jones, A., Browne, C., et al. (2016). C9orf72 Hexanucleotide Expansions Are Associated with Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *STEM CELLS* *34*, 2063–2078.

Dangond, F., Hwang, D., Camelo, S., Pasinelli, P., Frosch, M.P., Stephanopoulos, G., Stephanopoulos, G., Brown, R.H., and Gullans, S.R. (2004). Molecular signature of late-stage human ALS revealed by expression profiling of postmortem spinal cord gray matter. *Physiol. Genomics* *16*, 229–239.

Dantuma, N.P., and Bott, L.C. (2014). The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Front. Mol. Neurosci.* *7*.

Dasen, J.S. (2017). Master or servant? emerging roles for motor neuron subtypes in the construction and evolution of locomotor circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* *42*, 25–32.

Dasen, J.S., and Jessell, T.M. (2009). Chapter Six Hox Networks and the Origins of Motor Neuron Diversity. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Academic Press), pp. 169–200.

Davis-Dusenbery, B.N., Williams, L.A., Klim, J.R., and Eggan, K. (2014). How to make spinal motor neurons. *Development* *141*, 491–501.

De Vos, K.J., and Hafezparast, M. (2017). Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research? *Neurobiol. Dis.* *105*, 283–299.

DeJesus-Hernandez, M., Kocerha, J., Finch, N., Crook, R., Baker, M., Desaro, P., Johnston, A., Rutherford, N., Wojtas, A., Kennelly, K., et al. (2010). De novo truncating FUS gene mutation as a cause of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mutat.* *31*, E1377-1389.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* *72*, 245–256.

Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Alleaume-Butaux, A., Hjorth, J.J., Vignes, M., Schneider, B., Brugg, B., Viovy, J.-L., and Peyrin, J.-M. (2013). Synapto-protective drugs evaluation in reconstructed neuronal network. *PloS One* *8*, e71103.

Deleglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., Vignes, M., Viovy, J.-L., Jacotot, E., Peyrin, J.-M., et al. (2014). β -amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. *Acta Neuropathol. Commun.* *2*.

Deleglise, B., Lassus, B., Soubeyre, V., Doulazmi, M., Brugg, B., Vanhoutte, P., and Peyrin, J.-M. (2018). Dysregulated Neurotransmission induces Trans-synaptic degeneration in reconstructed Neuronal Networks. *Sci. Rep.* *8*, 11596.

Deng, H.-X., Zhai, H., Bigio, E.H., Yan, J., Fecto, F., Ajroud, K., Mishra, M., Ajroud-Driss, S., Heller, S., Sufit, R., et al. (2010). FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* *67*, 739–748.

- Deng, H.-X., Chen, W., Hong, S.-T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., et al. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477, 211.
- Desai, J., and Swash, M. (1999). Extrapyramidal involvement in amyotrophic lateral sclerosis: backward falls and retropulsion. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 67, 214–216.
- Devlin, A.-C., Burr, K., Borooah, S., Foster, J.D., Cleary, E.M., Geti, I., Vallier, L., Shaw, C.E., Chandran, S., and Miles, G.B. (2015). Human iPSC-derived motoneurons harbouring *TARDBP* or *C9ORF72* ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability. *Nat. Commun.* 6, 5999.
- Dewey, C.M., Cenik, B., Sephton, C.F., Johnson, B.A., Herz, J., and Yu, G. (2012). TDP-43 Aggregation In Neurodegeneration: Are Stress Granules The Key? *Brain Res.* 1462, 16–25.
- Di Giorgio, F.P., Boulting, G.L., Bobrowicz, S., and Eggan, K.C. (2008). Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell* 3, 637–648.
- Díaz-Alonso, J., Aguado, T., Wu, C.-S., Palazuelos, J., Hofmann, C., Garcez, P., Guillemot, F., Lu, H.-C., Lutz, B., Guzmán, M., et al. (2012). The CB(1) cannabinoid receptor drives corticospinal motor neuron differentiation through the Ctip2/Satb2 transcriptional regulation axis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 16651–16665.
- Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., et al. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Science* 321, 1218–1221.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 15–21.
- Doble, A. (1999). The Role of Excitotoxicity in Neurodegenerative Disease: Implications for Therapy. *Pharmacol. Ther.* 81, 163–221.
- Do-Ha, D., Buskila, Y., and Ooi, L. (2017). Impairments in Motor Neurons, Interneurons and Astrocytes Contribute to Hyperexcitability in ALS: Underlying Mechanisms and Paths to Therapy. *Mol. Neurobiol.*
- Donnelly, C.J., Grima, J.C., and Sattler, R. (2014). Aberrant RNA homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: potential for new therapeutic targets? *Neurodegener. Dis. Manag.* 4, 417–437.
- Douvaras, P., Wang, J., Zimmer, M., Hanchuk, S., O'Bara, M.A., Sadiq, S., Sim, F.J., Goldman, J., and Fossati, V. (2014). Efficient Generation of Myelinating Oligodendrocytes from Primary Progressive Multiple Sclerosis Patients by Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 3, 250–259.
- Douvaras, P., Sun, B., Wang, M., Kruglikov, I., Lалlos, G., Zimmer, M., Terrenoire, C., Zhang, B., Gandy, S., Schadt, E., et al. (2017). Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Microglia. *Stem Cell Rep.* 8, 1516–1524.
- Du, Z.-W., Chen, H., Liu, H., Lu, J., Qian, K., Huang, C.T.-L., Zhong, X., Fan, F., and Zhang, S.-C. (2015). Generation and Expansion of highly-pure Motor Neuron Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells. *Nat. Commun.* 6, 6626.
- Duflocq, A., Chareyre, F., Giovannini, M., Couraud, F., and Davenne, M. (2011). Characterization of the axon initial segment (AIS) of motor neurons and identification of a para-AIS and a juxtapara-AIS, organized by protein 4.1 B. *BMC Biol.* 9, 66.

Dupuis, L., Dengler, R., Heneka, M.T., Meyer, T., Zierz, S., Kassubek, J., Fischer, W., Steiner, F., Lindauer, E., Otto, M., et al. (2012). A Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Trial of Pioglitazone in Combination with Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* 7.

Durand, J., Amendola, J., Bories, C., and Lamotte d'Incamps, B. (2006). Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol. Paris* 99, 211–220.

Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., et al. (2012). Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci. Transl. Med.* 4, 145ra104-145ra104.

Ehrlich, M., Mozafari, S., Glatza, M., Starost, L., Velychko, S., Hallmann, A.-L., Cui, Q.-L., Schambach, A., Kim, K.-P., Bachelin, C., et al. (2017). Rapid and efficient generation of oligodendrocytes from human induced pluripotent stem cells using transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E2243–E2252.

Eisen, A., Kim, S., and Pant, B. (1992). Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve* 15, 219–224.

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

Elden, A.C., Kim, H.-J., Hart, M.P., Chen-Plotkin, A.S., Johnson, B.S., Fang, X., Armakola, M., Geser, F., Greene, R., Lu, M.M., et al. (2010). Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466, 1069–1075.

Elia, A.E., Lalli, S., Monsurrò, M.R., Sagnelli, A., Taiello, A.C., Reggiori, B., La Bella, V., Tedeschi, G., and Albanese, A. (2016). Tauroursodeoxycholic acid in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 23, 45–52.

EMA (2018). Assessment report Alsitek (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)).

Emdad, L., D'Souza, S.L., Kothari, H.P., Qadeer, Z.A., and Germano, I.M. (2012). Efficient differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells into functional astrocytes. *Stem Cells Dev.* 21, 404–410.

Enjin, A., Rabe, N., Nakanishi, S.T., Vallstedt, A., Gezelius, H., Memic, F., Lind, M., Hjalt, T., Tourtellotte, W.G., Bruder, C., et al. (2010). Identification of novel spinal cholinergic genetic subtypes disclose Chodl and Pitx2 as markers for fast motor neurons and partition cells. *J. Comp. Neurol.* 518, 2284–2304.

Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., and Jessell, T.M. (1996). Two Critical Periods of Sonic Hedgehog Signaling Required for the Specification of Motor Neuron Identity. *Cell* 87, 661–673.

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

Espuny-Camacho, I., Michelsen, K.A., Gall, D., Linaro, D., Hasche, A., Bonnefont, J., Bali, C., Orduz, D., Bilheu, A., Herpoel, A., et al. (2013). Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. *Neuron* 77, 440–456.

Faravelli, I., Bucchia, M., Rinchetti, P., Nizzardo, M., Simone, C., Frattini, E., and Corti, S. (2014). Motor neuron derivation from human embryonic and induced pluripotent stem cells: experimental approaches and clinical perspectives. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 87.

Farg, M.A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J.M., Yang, S., Atkinson, R.A.K., Levina, V., Halloran, M.A., Gleeson, P.A., Blair, I.P., Soo, K.Y., et al. (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic

lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3579–3595.

Fecto, F., Yan, J., Vemula, S.P., Liu, E., Yang, Y., Chen, W., Zheng, J.G., Shi, Y., Siddique, N., Arrat, H., et al. (2011). SQSTM1 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch. Neurol.* **68**, 1440–1446.

Feneberg, E., Oeckl, P., Steinacker, P., Verde, F., Barro, C., Van Damme, P., Gray, E., Grosskreutz, J., Jardel, C., Kuhle, J., et al. (2017). Multicenter evaluation of neurofilaments in early symptom onset amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*.

Ferraiuolo, L., Meyer, K., Sherwood, T.W., Vick, J., Likhite, S., Frakes, A., Miranda, C.J., Braun, L., Heath, P.R., Pineda, R., et al. (2016). Oligodendrocytes contribute to motor neuron death in ALS via SOD1-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E6496–E6505.

Fiesel, F.C., Voigt, A., Weber, S.S., Van den Haute, C., Waldenmaier, A., Görner, K., Walter, M., Anderson, M.L., Kern, J.V., Rasse, T.M., et al. (2010). Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. *EMBO J.* **29**, 209–221.

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

Figuerola-Romero, C., Hur, J., Bender, D.E., Delaney, C.E., Cataldo, M.D., Smith, A.L., Yung, R., Ruden, D.M., Callaghan, B.C., and Feldman, E.L. (2012). Identification of epigenetically altered genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PloS One* **7**, e52672.

Figuerola-Romero, C., Hur, J., Lunn, J.S., Paez-Colasante, X., Bender, D.E., Yung, R., Sakowski, S.A., and Feldman, E.L. (2016). Expression of microRNAs in human post-mortem amyotrophic lateral sclerosis spinal cords provides insight into disease mechanisms. *Mol. Cell. Neurosci.* **71**, 34–45.

Finlayson, M.H., and Martin, J.B. (1973). Cerebral lesions in familial amyotrophic lateral sclerosis and dementia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **26**, 237–246.

Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., and Glass, J.D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* **185**, 232–240.

Fogarty, M.J. (2018). Driven to decay: Excitability and synaptic abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res. Bull.* **140**, 318–333.

Fournier, C.N., Schoenfeld, D., Berry, J.D., Cudkowicz, M.E., Chan, J., Quinn, C., Brown, R.H., Salameh, J.S., Tansey, M.G., Beers, D.R., et al. (2018). An open label study of a novel immunosuppression intervention for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **19**, 242–249.

Fox, A.D., Ratti, A., Leclerc, A.L., Wu, C.-H., Gellera, C., Tiloca, C., Fallini, C., Bosco, D.A., Goldstein, D.B., Baron, D.M., et al. (2012). Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **488**, 499.

Francius, C., and Clotman, F. (2014). Generating spinal motor neuron diversity: a long quest for neuronal identity. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 813–829.

Freibaum, B.D., Lu, Y., Lopez-Gonzalez, R., Kim, N.C., Almeida, S., Lee, K.-H., Badders, N., Valentine, M., Miller, B.L., Wong, P.C., et al. (2015). GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature* **525**, 129–133.

Freischmidt, A., Wieland, T., Richter, B., Ruf, W., Schaeffer, V., Müller, K., Marroquin, N., Nordin, F., Hübers, A., Weydt, P., et al. (2015). Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat. Neurosci.* 18, 631.

Frijhoff, J., Winyard, P.G., Zarkovic, N., Davies, S.S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, A.R., Taylor, E.L., Oettrich, J., Ruskovska, T., et al. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* 23, 1144–1170.

Fujimori, K., Ishikawa, M., Otomo, A., Atsuta, N., Nakamura, R., Akiyama, T., Hadano, S., Aoki, M., Saya, H., Sobue, G., et al. (2018). Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat. Med.*

Gaiani, A., Martinelli, I., Bello, L., Querin, G., Puthenparampil, M., Ruggero, S., Toffanin, E., Cagnin, A., Briani, C., Pegoraro, E., et al. (2017). Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Neurofilament Light Chain Levels in Definite Subtypes of Disease. *JAMA Neurol.* 74, 525–532.

Gajowiak, A., Styś, A., Starzyński, R.R., Staroń, R., and Lipiński, P. (2016). Misregulation of iron homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis. *Postepy Hig. Med. Doswiadczalnej Online* 70, 709–721.

Gallo, V., Vanacore, N., Bueno-de-Mesquita, H.B., Vermeulen, R., Brayne, C., Pearce, N., Wark, P.A., Ward, H.A., Ferrari, P., Jenab, M., et al. (2016). Physical activity and risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis in a prospective cohort study. *Eur. J. Epidemiol.* 31, 255–266.

Galloway, P.G., Perry, G., and Gambetti, P. (1987). Hirano body filaments contain actin and actin-associated proteins. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46, 185–199.

Galve-Roperh, I., Manuel Guzmán, Díaz-Alonso, and Aguado Sanchez, (2012). Corticospinal upper motor neurons, methods and compositions for differentiating neural stem cells by modulating CB1 cannabinoid receptor signaling and uses thereof.

Gao, Y.-L., Wang, N., Sun, F.-R., Cao, X.-P., Zhang, W., and Yu, J.-T. (2018). Tau in neurodegenerative disease. *Ann. Transl. Med.* 6, 175.

Garcia, M.L., Singleton, A.B., Hernandez, D., Ward, C.M., Evey, C., Sapp, P.A., Hardy, J., Brown, R.H., and Cleveland, D.W. (2006). Mutations in neurofilament genes are not a significant primary cause of non-SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 21, 102–109.

Garcia-Huerta, P., Troncoso-Escudero, P., Jerez, C., Hetz, C., and Vidal, R.L. (2016). The intersection between growth factors, autophagy and ER stress: A new target to treat neurodegenerative diseases? *Brain Res.* 1649, 173–180.

Gardiner, P.F. (1993). Physiological properties of motoneurons innervating different muscle unit types in rat gastrocnemius. *J. Neurophysiol.* 69, 1160–1170.

Gaspard, N., Bouschet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., van den Aemele, J., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S.N., et al. (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 455, 351–357.

Gaspard, N., Bouschet, T., Herpoel, A., Naeije, G., van den Aemele, J., and Vanderhaeghen, P. (2009). Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* 4, 1454–1463.

Gautier, C.A., Erpapazoglou, Z., Mouton-Liger, F., Muriel, M.P., Cormier, F., Bigou, S., Duffaure, S., Girard, M., Foret, B., Iannielli, A., et al. (2016). The endoplasmic reticulum-mitochondria interface is perturbed in PARK2 knockout mice and patients with PARK2 mutations. *Hum. Mol. Genet.* 25, 2972–2984.

- Geevasinga, N., Menon, P., Yiannikas, C., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2014). Diagnostic utility of cortical excitability studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 21, 1451–1457.
- Gentileschi, V., Muggia, S., Poloni, M., and Spinnler, H. (1999). Fronto-Temporal Dementia and Motor Neuron Disease: a neuropsychological study. *Acta Neurol. Scand.* 100, 341–349.
- Geuens, T., Bouhy, D., and Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum. Genet.* 135, 851–867.
- Ghasemi, M., and Brown, R.H. (2018). Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8, a024125.
- Gibbs, K.L., Kalmar, B., Rhymes, E.R., Fellows, A.D., Ahmed, M., Whiting, P., Davies, C.H., Greensmith, L., and Schiavo, G. (2018). Inhibiting p38 MAPK alpha rescues axonal retrograde transport defects in a mouse model of ALS. *Cell Death Dis.* 9, 596.
- Gilbert, S.F. (2000). Differentiation of the Neural Tube.
- Gillingwater, T.H., and Ribchester, R.R. (2001). Compartmental neurodegeneration and synaptic plasticity in the Wlds mutant mouse. *J. Physiol.* 534, 627–639.
- Gitler, A.D., and Tsujii, H. (2016). There has been an awakening: Emerging mechanisms of C9orf72 mutations in FTD/ALS. *Brain Res.* 1647, 19–29.
- Gkogkas, C., Middleton, S., Kremer, A.M., Wardrope, C., Hannah, M., Gillingwater, T.H., and Skehel, P. (2008). VAPB interacts with and modulates the activity of ATF6. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1517–1526.
- Gordon, P.H., Moore, D.H., Miller, R.G., Florence, J.M., Verheijde, J.L., Doorish, C., Hilton, J.F., Spitalny, G.M., MacArthur, R.B., Mitsumoto, H., et al. (2007). Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol.* 6, 1045–1053.
- Gordon, P.H., Cheung, Y.-K., Levin, B., Andrews, H., Doorish, C., Macarthur, R.B., Montes, J., Bednarz, K., Florence, J., Rowin, J., et al. (2008). A novel, efficient, randomized selection trial comparing combinations of drug therapy for ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 9, 212–222.
- Gou, J.P., Eyer, J., and Letierrier, J.F. (1995). Progressive hyperphosphorylation of neurofilament heavy subunits with aging: possible involvement in the mechanism of neurofilament accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 368–376.
- Gould, T.W., Buss, R.R., Vinsant, S., Prevet, D., Sun, W., Knudson, C.M., Milligan, C.E., and Oppenheim, R.W. (2006). Complete Dissociation of Motor Neuron Death from Motor Dysfunction by Bax Deletion in a Mouse Model of ALS. *J. Neurosci.* 26, 8774–8786.
- Gouti, M., Tsakiridis, A., Wymeersch, F.J., Huang, Y., Kleinjung, J., Wilson, V., and Briscoe, J. (2014). In Vitro Generation of Neuromesodermal Progenitors Reveals Distinct Roles for Wnt Signalling in the Specification of Spinal Cord and Paraxial Mesoderm Identity. *PLoS Biol.* 12.
- Graf, M., Ecker, D., Horowski, R., Kramer, B., Riederer, P., Gerlach, M., Hager, C., Ludolph, A.C., Becker, G., Osterhage, J., et al. (2005). High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 112, 649–660.
- Gratten, J., Zhao, Q., Benyamin, B., Garton, F., He, J., Leo, P.J., Mangelsdorf, M., Anderson, L., Zhang, Z.-H., Chen, L., et al. (2017). Whole-exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis suggests NEK1 is a risk gene in Chinese. *Genome Med.* 9, 97.

- Green, A., Russ, C., Donaghy, C., Kieran, D., Prehn, J., Acharya, K.R., Morrison, K.E., Greenway, M.J., Hardiman, O., Andersen, P.M., et al. (2006). ANG mutations segregate with familial and “sporadic” amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 38, 411.
- Gregory, J.M., Barros, T.P., Meehan, S., Dobson, C.M., and Luheshi, L.M. (2012). The Aggregation and Neurotoxicity of TDP-43 and Its ALS-Associated 25 kDa Fragment Are Differentially Affected by Molecular Chaperones in *Drosophila*. *PLoS ONE* 7.
- Gros-Louis, F., Larivière, R., Gowing, G., Laurent, S., Camu, W., Bouchard, J.-P., Meininger, V., Rouleau, G.A., and Julien, J.-P. (2004). A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 279, 45951–45956.
- Group MCI-186 (2017). Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 16, 505–512.
- Gu, J., Chen, F., Iqbal, K., Gong, C.-X., Wang, X., and Liu, F. (2017). Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates alternative splicing of tau exon 10: Implications for the pathogenesis of tauopathies. *J. Biol. Chem.* 292, 10600–10612.
- Guiney, S.J., Adlard, P.A., Bush, A.I., Finkelstein, D.I., and Ayton, S. (2017). Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson’s disease. *Neurochem. Int.* 104, 34–48.
- Guo, F., Jiao, F., Song, Z., Li, S., Liu, B., Yang, H., Zhou, Q., and Li, Z. (2015). Regulation of MALAT1 expression by TDP43 controls the migration and invasion of non-small cell lung cancer cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 465, 293–298.
- Guo, H., Lai, L., Butchbach, M.E.R., Stockinger, M.P., Shan, X., Bishop, G.A., and Lin, C.G. (2003). Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2519–2532.
- Guo, W., Naujock, M., Fumagalli, L., Vandoorne, T., Baatsen, P., Boon, R., Ordovás, L., Patel, A., Welters, M., Vanwelden, T., et al. (2017a). HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients. *Nat. Commun.* 8.
- Guo, W., Fumagalli, L., Prior, R., and Van Den Bosch, L. (2017b). Current Advances and Limitations in Modeling ALS/FTD in a Dish Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Front. Neurosci.* 11.
- Gupta, R.M., Meissner, T.B., Cowan, C.A., and Musunuru, K. (2016). Genome-Edited Human Pluripotent Stem Cell-Derived Macrophages as a Model of Reverse Cholesterol Transport—Brief Report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 15–18.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., and Deng, H.X. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775.
- Guseva, D., Jakovcevski, I., Irintchev, A., Leshchyns’ka, I., Sytnyk, V., Ponimaskin, E., and Schachner, M. (2018). Cell Adhesion Molecule Close Homolog of L1 (CHL1) Guides the Regrowth of Regenerating Motor Axons and Regulates Synaptic Coverage of Motor Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 11.
- Gutman, C.R., Ajmera, M.K., and Hollyday, M. (1993). Organization of motor pools supplying axial muscles in the chicken. *Brain Res.* 609, 129–136.
- Haenseler, W., Sansom, S.N., Buchrieser, J., Newey, S.E., Moore, C.S., Nicholls, F.J., Chintawar, S., Schnell, C., Antel, J.P., Allen, N.D., et al. (2017). A Highly Efficient Human Pluripotent Stem Cell Microglia Model Displays a Neuronal-Co-culture-Specific Expression Profile and Inflammatory Response. *Stem Cell Rep.* 8, 1727–1742.

Haeusler, A.R., Donnelly, C.J., Periz, G., Simko, E.A.J., Shaw, P.G., Kim, M.-S., Maragakis, N.J., Troncoso, J.C., Pandey, A., Sattler, R., et al. (2014). C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* 507, 195–200.

Haidet-Phillips, A.M., Hester, M.E., Miranda, C.J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M.J., Foust, K.D., et al. (2011). Astrocytes from Familial and Sporadic ALS Patients are Toxic to Motor Neurons. *Nat. Biotechnol.* 29, 824–828.

Hammer, R.P., Tomiyasu, U., and Scheibel, A.B. (1979). Degeneration of the human Betz cell due to amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 63, 336–346.

Han, J.-H., Yu, T.-H., Ryu, H.-H., Jun, M.-H., Ban, B.-K., Jang, D.-J., and Lee, J.-A. (2013). ALS/FTLD-linked TDP-43 regulates neurite morphology and cell survival in differentiated neurons. *Exp. Cell Res.* 319, 1998–2005.

Harada, C.N., Natelson Love, M.C., and Triebel, K. (2013). Normal Cognitive Aging. *Clin. Geriatr. Med.* 29, 737–752.

Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E.M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P.J., Simmons, Z., and Berg, L.H. van den (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17071.

Hasboun, D. (2013). Neuroanatomie fonctionnelle.

He, C.Z., and Hays, A.P. (2004). Expression of peripherin in ubiquitinated inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 217, 47–54.

He, X., Zhang, L., Yao, X., Hu, J., Yu, L., Jia, H., An, R., Liu, Z., and Xu, Y. (2013). Association studies of MMP-9 in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 8, e73777.

Hedlund, E., Karlsson, M., Osborn, T., Ludwig, W., and Isacson, O. (2010). Global gene expression profiling of somatic motor neuron populations with different vulnerability identify molecules and pathways of degeneration and protection. *Brain* 133, 2313–2330.

Hedstrom, K.L., Xu, X., Ogawa, Y., Frischknecht, R., Seidenbecher, C.I., Shrager, P., and Rasband, M.N. (2007). Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J. Cell Biol.* 178, 875–886.

Henkel, J.S., Engelhardt, J.I., Siklós, L., Simpson, E.P., Kim, S.H., Pan, T., Goodman, J.C., Siddique, T., Beers, D.R., and Appel, S.H. (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann. Neurol.* 55, 221–235.

Hensel, N., and Claus, P. (2018). The Actin Cytoskeleton in SMA and ALS: How Does It Contribute to Motoneuron Degeneration? *The Neuroscientist* 24, 54–72.

Henty-Ridilla, J.L., Juanes, M.A., and Goode, B.L. (2017). Profilin Directly Promotes Microtubule Growth through Residues Mutated in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Biol.* 27, 3535-3543.e4.

Hester, M.E., Murtha, M.J., Song, S., Rao, M., Miranda, C.J., Meyer, K., Tian, J., Boulting, G., Schaffer, D.V., Zhu, M.X., et al. (2011). Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 1905–1912.

Higelin, J., Demestre, M., Putz, S., Dellling, J.P., Jacob, C., Lutz, A.-K., Bausinger, J., Huber, A.-K., Klingenstein, M., Barbi, G., et al. (2016). FUS Mislocalization and Vulnerability to DNA Damage in ALS Patients Derived hiPSCs and Aging Motoneurons. *Front. Cell. Neurosci.* 10.

- Higgins, C.M., Jung, C., and Xu, Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci.* 4, 16.
- Hirano, A. (1994). Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20, 3–11.
- Hirano, A. (1996). Neuropathology of ALS. *Neurology* 47, 63S.
- Hirano, A., Arumugasamy, N., and Zimmerman, H.M. (1967). Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Comparison of Guam and Classical Cases. *Arch. Neurol.* 16, 357–363.
- Holmgren, A., Bouhy, D., and Timmerman, V. (2012). Neurofilament phosphorylation and their proline-directed kinases in health and disease. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 17, 365–376.
- Hosler, B.A., Siddique, T., Sapp, P.C., Sailor, W., Huang, M.C., Hossain, A., Daube, J.R., Nance, M., Fan, C., Kaplan, J., et al. (2000). Linkage of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis With Frontotemporal Dementia to Chromosome 9q21-q22. *JAMA* 284, 1664–1669.
- Howells, J., Matamala, J.M., Park, S.B., Garg, N., Vucic, S., Bostock, H., Burke, D., and Kiernan, M.C. (2018). In vivo evidence for reduced ion channel expression in motor axons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol.*
- Hsieh, S.T., Kidd, G.J., Crawford, T.O., Xu, Z., Lin, W.M., Trapp, B.D., Cleveland, D.W., and Griffin, J.W. (1994). Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 6392–6401.
- Hsu, W.-C.J., Nilsson, C.L., and Laezza, F. (2014). Role of the Axonal Initial Segment in Psychiatric Disorders: Function, Dysfunction, and Intervention. *Front. Psychiatry* 5.
- Hu, B.-Y., and Zhang, S.-C. (2009). Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat. Protoc.* 4, 1295–1304.
- Hu, B.-Y., Du, Z.-W., and Zhang, S.-C. (2009). Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 4, 1614–1622.
- Hu, X., Yang, Y., Su, J., and Yao, C. (2016). Meta-analysis of the relationship between amyotrophic lateral sclerosis and susceptibility to serum ferritin level elevation. *Neurosciences* 21, 120–125.
- Huang, C.Y.-M., and Rasband, M.N. (2018). Axon initial segments: structure, function, and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1420, 46–61.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702–705.
- Ichiyanagi, N., Fujimori, K., Yano, M., Ishihara-Fujisaki, C., Sone, T., Akiyama, T., Okada, Y., Akamatsu, W., Matsumoto, T., Ishikawa, M., et al. (2016). Establishment of In Vitro FUS-Associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 6, 496–510.
- Ignjatović, A., Stević, Z., Lavrić, S., Daković, M., and Bačić, G. (2013). Brain iron MRI: a biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* 38, 1472–1479.
- Imaizumi, M., Hirotsu, M., and Soga, T. (2015). Study on effect of an intermediate buffer layer structure on the growth of GaAs layers on GaP substrates. In 2015 IEEE 42nd Photovoltaic Specialist Conference (PVSC), pp. 1–5.

- Imamura, K., Izumi, Y., Watanabe, A., Tsukita, K., Woltjen, K., Yamamoto, T., Hotta, A., Kondo, T., Kitaoka, S., Ohta, A., et al. (2017). The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Transl. Med.* 9.
- Ingre, C., Roos, P.M., Piehl, F., Kamel, F., and Fang, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Epidemiol.* 7, 181–193.
- International Stem Cell Banking Initiative (2009). Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem Cell Rev.* 5, 301–314.
- Isaacs, J.D., Dean, A.F., Shaw, C.E., Al-Chalabi, A., Mills, K.R., and Leigh, P.N. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis with sensory neuropathy: part of a multisystem disorder? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 78, 750–753.
- Isak, B., Tankisi, H., Johnsen, B., Pugdahl, K., Finnerup, N.B., and Fuglsang-Frederiksen, A. (2016). Laser and somatosensory evoked potentials in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* 127, 3322–3328.
- Iwai, Y., Shibuya, K., Misawa, S., Sekiguchi, Y., Watanabe, K., Amino, H., and Kuwabara, S. (2016). Axonal Dysfunction Precedes Motor Neuronal Death in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* 11.
- Iwatsubo, T., Kuzuhara, S., Kanemitsu, A., Shimada, H., and Toyokura, Y. (1990). Corticofugal projections to the motor nuclei of the brainstem and spinal cord in humans. *Neurology* 40, 309–312.
- Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E.D., De Zeeuw, C.I., and Hoogenraad, C.C. (2008). Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase Is Sufficient to Induce Amyotrophic Lateral Sclerosis in Transgenic Mice. *J. Neurosci.* 28, 2075–2088.
- Jessell, T.M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* 1, 20.
- Ji, A.-L., Zhang, X., Chen, W.-W., and Huang, W.-J. (2017). Genetics insight into the amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum. *J. Med. Genet.* 54, 145–154.
- Jiang, J., Zhu, Q., Gendron, T.F., Saberi, S., McAlonis-Downes, M., Seelman, A., Stauffer, J.E., Jafar-Nejad, P., Drenner, K., Schulte, D., et al. (2016). Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron* 90, 535–550.
- Jiang, M.C., Adimula, A., Birch, D., and Heckman, C.J. (2017). Hyperexcitability in synaptic and firing activities of spinal motoneurons in an adult mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 362, 33–46.
- Johnson, B.S., McCaffery, J.M., Lindquist, S., and Gitler, A.D. (2008). A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6439–6444.
- Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Deerlin, V.M.V., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., et al. (2010). Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS. *Neuron* 68, 857–864.
- Johnson, J.O., Glynn, S.M., Gibbs, J.R., Nalls, M.A., Sabatelli, M., Restagno, G., Drory, V.E., Chiò, A., Rogaeva, E., and Traynor, B.J. (2014a). Mutations in the CHCHD10 gene are a common cause of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J. Neurol.* 137, e311.
- Johnson, J.O., Pioro, E.P., Boehringer, A., Chia, R., Feit, H., Renton, A.E., Pliner, H.A., Abramzon, Y., Marangi, G., Winborn, B.J., et al. (2014b). Mutations in the Matr3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* 17, 664.

- Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* *143*, 1883–1898.
- Jones, S.L., and Svitkina, T.M. (2016). Axon Initial Segment Cytoskeleton: Architecture, Development, and Role in Neuron Polarity. *Neural Plast.* *2016*.
- Juneja, T., Pericak-Vance, M.A., Laing, N.G., Dave, S., and Siddique, T. (1997). Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu,Zn superoxide dismutase. *Neurology* *48*, 55–57.
- Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Vande Velde, C., Bouchard, J.-P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., et al. (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* *40*, 572–574.
- Kanai, K., Kuwabara, S., Misawa, S., Tamura, N., Ogawara, K., Nakata, M., Sawai, S., Hattori, T., and Bostock, H. (2006). Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain* *129*, 953–962.
- Kanai, K., Shibuya, K., Sato, Y., Misawa, S., Nasu, S., Sekiguchi, Y., Mitsuma, S., Iose, S., Fujimaki, Y., Ohmori, S., et al. (2012). Motor axonal excitability properties are strong predictors for survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *83*, 734–738.
- Kang, S.H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D.W., Ostrow, L.W., Rothstein, J.D., and Bergles, D.E. (2013). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* *16*, 571–579.
- Kanning, K.C., Kaplan, A., and Henderson, C.E. (2010). Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* *33*, 409–440.
- Kapeli, K., Martinez, F.J., and Yeo, G.W. (2017). Genetic mutations in RNA-binding proteins and their roles in ALS. *Hum. Genet.* *136*, 1193–1214.
- Kaplan, A., Spiller, K.J., Towne, C., Kanning, K.C., Choe, G.T., Geber, A., Akay, T., Aebischer, P., and Henderson, C.E. (2014). Neuronal Matrix Metalloproteinase-9 Is a Determinant of Selective Neurodegeneration. *Neuron* *81*, 333–348.
- Kar, A., Kuo, D., He, R., Zhou, J., and Wu, J.Y. (2005). Tau Alternative Splicing and Frontotemporal Dementia. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* *19*, S29–S36.
- Kaspar, B.K., Lladó, J., Sherkat, N., Rothstein, J.D., and Gage, F.H. (2003). Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* *301*, 839–842.
- Kato, S. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *115*, 97–114.
- Kaufmann, P., Thompson, J.L.P., Levy, G., Buchsbaum, R., Shefner, J., Krivickas, L.S., Katz, J., Rollins, Y., Barohn, R.J., Jackson, C.E., et al. (2009). Phase II trial of CoQ10 for ALS finds insufficient evidence to justify Phase III. *Ann. Neurol.* *66*, 235–244.
- Kawahara, Y., and Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3347–3352.
- Kawahara, Y., Kwak, S., Sun, H., Ito, K., Hashida, H., Aizawa, H., Jeong, S.-Y., and Kanazawa, I. (2003). Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J. Neurochem.* *85*, 680–689.
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T., and McGeer, P.L. (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am. J. Pathol.* *140*, 691–707.

- Kenna, K.P., van Doormaal, P.T.C., Dekker, A.M., Ticozzi, N., Kenna, B.J., Diekstra, F.P., van Rheenen, W., van Eijk, K.R., Jones, A.R., Keagle, P., et al. (2016). NEK1 variants confer susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* *48*, 1037–1042.
- Kevenaar, J.T., and Hoogenraad, C.C. (2015). The axonal cytoskeleton: from organization to function. *Front. Mol. Neurosci.* *8*.
- Khalil, M., Teunissen, C.E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M.P., Gattringer, T., Barro, C., Kappos, L., Comabella, M., Fazekas, F., et al. (2018). Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.*
- Kim, H.J., Kim, N.C., Wang, Y.-D., Scarborough, E.A., Moore, J., Diaz, Z., MacLea, K.S., Freibaum, B., Li, S., Mollie, A., et al. (2013). Prion-like domain mutations in hnRNPs cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* *495*, 467–473.
- Kim, H.-S., Lee, J., Lee, D.Y., Kim, Y.-D., Kim, J.Y., Lim, H.J., Lim, S., and Cho, Y.S. (2017). Schwann Cell Precursors from Human Pluripotent Stem Cells as a Potential Therapeutic Target for Myelin Repair. *Stem Cell Rep.* *8*, 1714–1726.
- Kim, S.H., Shanware, N.P., Bowler, M.J., and Tibbetts, R.S. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA. *J. Biol. Chem.* *285*, 34097–34105.
- Kioumourtoglou, M.-A., Rotem, R.S., Seals, R.M., Gredal, O., Hansen, J., and Weisskopf, M.G. (2015). Diabetes Mellitus, Obesity, and Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Population-Based Study. *JAMA Neurol.* *72*, 905–911.
- Kirby, J., Goodall, E.F., Smith, W., Highley, J.R., Masanzu, R., Hartley, J.A., Hibberd, R., Hollinger, H.C., Wharton, S.B., Morrison, K.E., et al. (2010). Broad clinical phenotypes associated with TAR-DNA binding protein (TARDBP) mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* *11*, 217–225.
- Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L.A., Boulting, G.L., Moccia, R., Wainger, B.J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., et al. (2014). Pathways Disrupted in Human ALS Motor Neurons Identified through Genetic Correction of Mutant SOD1. *Cell Stem Cell* *14*, 781–795.
- Knierim, J. (2018). Spinal Reflexes and Descending Motor Pathways (Section 3, Chapter 2).
- Kollewe, K., Mauss, U., Krampfl, K., Petri, S., Dengler, R., and Mohammadi, B. (2008). ALSFRS-R score and its ratio: a useful predictor for ALS-progression. *J. Neurol. Sci.* *275*, 69–73.
- Komada, M., and Soriano, P. (2002). β IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J. Cell Biol.* *156*, 337–348.
- Kong, J., and Xu, Z. (2000). Overexpression of neurofilament subunit NF-L and NF-H extends survival of a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* *281*, 72–74.
- Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* *10*, 524–530.
- Kostic, V., Jackson-Lewis, V., de Bilbao, F., Dubois-Dauphin, M., and Przedborski, S. (1997). Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* *277*, 559–562.
- Kovalchuk, M.O., Heuberger, J.A.A.C., Sleutjes, B.T.H.M., Ziagos, D., van den Berg, L.H., Ferguson, T.A., Franssen, H., and Groeneveld, G.J. (2018). Acute Effects of Riluzole and Retigabine on Axonal Excitability in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *Clin. Pharmacol. Ther.*

Križ, J., Zhu, Q., Julien, J.-P., and Padjen, A.L. (2000a). Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain Res.* *885*, 32–44.

Križ, J., Meier, J., Julien, J.P., and Padjen, A.L. (2000b). Altered ionic conductances in axons of transgenic mouse expressing the human neurofilament heavy gene: A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* *163*, 414–421.

Kruminis-Kaszkiel, E., Juranek, J., Maksymowicz, W., and Wojtkiewicz, J. (2018). CRISPR/Cas9 Technology as an Emerging Tool for Targeting Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 906.

Kwiatkowski, T.J., Bosco, D.A., LeClerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., et al. (2009). Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* *323*, 1205–1208.

Kwon, S., Zhang, Y., and Matthias, P. (2007). The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev.* *21*, 3381–3394.

Lachmann, N., Ackermann, M., Frenzel, E., Liebhaber, S., Brenig, S., Happle, C., Hoffmann, D., Klimenkova, O., Lüttge, D., Buchegger, T., et al. (2015). Large-Scale Hematopoietic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Provides Granulocytes or Macrophages for Cell Replacement Therapies. *Stem Cell Rep.* *4*, 282–296.

Laferriere, F., and Polymenidou, M. (2015). Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Swiss Med. Wkly.*

Lafon, M. (2011). Evasive strategies in rabies virus infection. *Adv. Virus Res.* *79*, 33–53.

Lagier-Tourenne, C., and Cleveland, D.W. (2009). Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell* *136*, 1001–1004.

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

Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K.R., Vu, A.Q., Baughn, M., Huelga, S.C., Clutario, K.M., Ling, S.-C., Liang, T.Y., Mazur, C., et al. (2012). Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat. Neurosci.* *15*, 1488–1497.

LaMarca, E.A., Powell, S.K., Akbarian, S., and Brennand, K.J. (2018). Modeling Neuropsychiatric and Neurodegenerative Diseases With Induced Pluripotent Stem Cells. *Front. Pediatr.* *6*.

Lamas, N.J., Johnson-Kerner, B., Roybon, L., Kim, Y.A., Garcia-Diaz, A., Wichterle, H., and Henderson, C.E. (2014). Neurotrophic Requirements of Human Motor Neurons Defined Using Amplified and Purified Stem Cell-Derived Cultures. *PLoS ONE* *9*.

Lange, D.J., Shahbazi, M., Silani, V., Ludolph, A.C., Weishaupt, J.H., Ajroud-Driss, S., Fields, K.G., Remanan, R., Appel, S.H., Morelli, C., et al. (2017). Pyrimethamine significantly lowers cerebrospinal fluid Cu/Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 mutations. *Ann. Neurol.* *81*, 837–848.

Larroquette, F., Seto, L., Gaub, P.L., Kamal, B., Wallis, D., Larivière, R., Vallée, J., Robitaille, R., and Tsuda, H. (2015). Vapb/Amyotrophic lateral sclerosis 8 knock-in mice display slowly progressive motor behavior defects accompanying ER stress and autophagic response. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 6515–6529.

Lattante, S., Conte, A., Zollino, M., Luigetti, M., Del Grande, A., Marangi, G., Romano, A., Marcaccio, A., Meleo, E., Bisogni, G., et al. (2012). Contribution of major amyotrophic lateral sclerosis genes to the etiology of sporadic disease. *Neurology* *79*, 66–72.

- Lee, H., Shamy, G.A., Elkabetz, Y., Schofield, C.M., Harrision, N.L., Panagiotakos, G., Socci, N.D., Tabar, V., and Studer, L. (2007). Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 1931–1939.
- Lee, J.-H., Liu, J.-W., Lin, S.-Z., Harn, H.-J., and Chiou, T.-W. (2018). Advances in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Shed Light on Drug Discovery for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cell Transplant.* 963689718785154.
- Leigh, P.N., Anderton, B.H., Dodson, A., Gallo, J.M., Swash, M., and Power, D.M. (1988). Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neurosci. Lett.* 93, 197–203.
- Lemonnier, T., Blanchard, S., Toli, D., Roy, E., Bigou, S., Froissart, R., Rouvet, I., Vitry, S., Heard, J.M., and Bohl, D. (2011). Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3653–3666.
- Lenglet, T., Lacomblez, L., Abitbol, J.L., Ludolph, A., Mora, J.S., Robberecht, W., Shaw, P.J., Pruss, R.M., Cuvier, V., Meininger, V., et al. (2014). A phase II-III trial of olesoxime in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 21, 529–536.
- Lenzi, J., De Santis, R., de Turreis, V., Morlando, M., Laneve, P., Calvo, A., Caliendo, V., Chiò, A., Rosa, A., and Bozzoni, I. (2015). ALS mutant FUS proteins are recruited into stress granules in induced pluripotent stem cell-derived motoneurons. *Dis. Model. Mech.* 8, 755–766.
- Leterrier, C. (2016). The Axon Initial Segment, 50Years Later: A Nexus for Neuronal Organization and Function. *Curr. Top. Membr.* 77, 185–233.
- Leterrier, C. (2018). The Axon Initial Segment: An Updated Viewpoint. *J. Neurosci.* 38, 2135–2145.
- Leterrier, C., Potier, J., Caillol, G., Debarnot, C., Rueda Boroni, F., and Dargent, B. (2015). Nanoscale Architecture of the Axon Initial Segment Reveals an Organized and Robust Scaffold. *Cell Rep.* 13, 2781–2793.
- Leung, C.L., He, C.Z., Kaufmann, P., Chin, S.S., Naini, A., Liem, R.K.H., Mitsumoto, H., and Hays, A.P. (2004). A pathogenic peripherin gene mutation in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 14, 290–296.
- Levine, T.D., Bowser, R., Hank, N.C., Gately, S., Stephan, D., Saperstein, D.S., and Van Keuren-Jensen, K. (2012). A Pilot Trial of Pioglitazone HCl and Tretinoin in ALS: Cerebrospinal Fluid Biomarkers to Monitor Drug Efficacy and Predict Rate of Disease Progression. *Neurol. Res. Int.* 2012, 582075.
- Lewis, D.A. (2011). The Chandelier Neuron in Schizophrenia. *Dev. Neurobiol.* 71, 118–127.
- Li, H.-F., and Wu, Z.-Y. (2016). Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis. *Transl. Neurodegener.* 5.
- Li, K., and Reichmann, H. (2016). Role of iron in neurodegenerative diseases. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 123, 389–399.
- Li, C., Klco, J.M., Helton, N.M., George, D.R., Mudd, J.L., Miller, C.A., Lu, C., Fulton, R., O’Laughlin, M., Fronick, C., et al. (2015). Genetic Heterogeneity of Induced Pluripotent Stem Cells: Results from 24 Clones Derived from a Single C57BL/6 Mouse. *PLOS ONE* 10, e0120585.
- Li, L., Chao, J., and Shi, Y. (2018). Modeling neurological diseases using iPSC-derived neural cells. *Cell Tissue Res.* 371, 143–151.

Li, X.-J., Hu, B.-Y., Jones, S.A., Zhang, Y.-S., Lavaute, T., Du, Z.-W., and Zhang, S.-C. (2008). Directed Differentiation of Ventral Spinal Progenitors and Motor Neurons from Human Embryonic Stem Cells by Small Molecules. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 886–893.

Li, Y.R., King, O.D., Shorter, J., and Gitler, A.D. (2013). Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J. Cell Biol.* 201, 361–372.

Lin, J., Wang, C., Yang, C., Fu, S., and Redies, C. (2016). Pax3 and Pax7 interact reciprocally and regulate the expression of cadherin-7 through inducing neuron differentiation in the developing chicken spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 524, 940–962.

Linse, K., Ruger, W., Joos, M., Schmitz-Peiffer, H., Storch, A., and Hermann, A. (2017). Usability of eyetracking computer systems and impact on psychological wellbeing in patients with advanced amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 0, 1–8.

Liu, M.-L., Zang, T., and Zhang, C.-L. (2016). Direct Lineage Reprogramming Reveals Disease-Specific Phenotypes of Motor Neurons from Human ALS Patients. *Cell Rep.* 14, 115–128.

Liu, X., Chen, J., liu, W., Li, X., Chen, Q., Liu, T., Gao, S., and Deng, M. (2015). The fused in sarcoma protein forms cytoplasmic aggregates in motor neurons derived from integration-free induced pluripotent stem cells generated from a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the FUS-P525L mutation. *Neurogenetics* 16, 223–231.

Lopate, G., Baloh, R.H., Al-Lozi, M.T., Miller, T.M., Fernandes Filho, J.A., Ni, O., Leston, A., Florence, J., Schierbecker, J., and Allred, P. (2010). Familial ALS with extreme phenotypic variability due to the I113T SOD1 mutation. *Amyotroph. Lateral Scler.* 11, 232–236.

Lopez-Gonzalez, R., Lu, Y., Gendron, T.F., Karydas, A., Tran, H., Yang, D., Petrucelli, L., Miller, B.L., Almeida, S., and Gao, F.-B. (2016). Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron* 92, 383–391.

Lorenzl, S., Narr, S., Angele, B., Krell, H.W., Gregorio, J., Kiaei, M., Pfister, H.-W., and Beal, M.F. (2006). The matrix metalloproteinases inhibitor Ro 28-2653 [correction of Ro 26-2853] extends survival in transgenic ALS mice. *Exp. Neurol.* 200, 166–171.

Louwerse, E.S., Visser, C.E., Bossuyt, P.M., and Weverling, G.J. (1997). Amyotrophic lateral sclerosis: mortality risk during the course of the disease and prognostic factors. The Netherlands ALS Consortium. *J. Neurol. Sci.* 152 Suppl 1, S10-17.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.

Lowe, J., Lennox, G., Jefferson, D., Morrell, K., McQuire, D., Gray, T., Landon, M., Doherty, F.J., and Mayer, R.J. (1988). A filamentous inclusion body within anterior horn neurones in motor neurone disease defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *Neurosci. Lett.* 94, 203–210.

Łukaszewicz-Zajac, M., Mroczko, B., and Słownik, A. (2014). Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J. Neural Transm.* 121, 1387–1397.

Macchi, Z., Wang, Y., Moore, D., Katz, J., Saperstein, D., Walk, D., Simpson, E., Genge, A., Bertorini, T., Fernandes, J.A., et al. (2015). A multi-center screening trial of rasagiline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Possible mitochondrial biomarker target engagement. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 16, 345–352.

Mackenzie, I.R., Nicholson, A.M., Sarkar, M., Messing, J., Purice, M.D., Pottier, C., Annu, K., Baker, M., Perkerson, R.B., Kurti, A., et al. (2017). TIA1 Mutations in Amyotrophic Lateral

Sclerosis and Frontotemporal Dementia Promote Phase Separation and Alter Stress Granule Dynamics. *Neuron* 95, 808-816.e9.

Maekawa, S., Al-Sarraj, S., Kibble, M., Landau, S., Parnavelas, J., Cotter, D., Everall, I., and Leigh, P.N. (2004). Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain J. Neurol.* 127, 1237–1251.

Maekawa, S., Leigh, P.N., King, A., Jones, E., Steele, J.C., Bodi, I., Shaw, C.E., Hortobagyi, T., and Al-Sarraj, S. (2009). TDP-43 is consistently co-localized with ubiquitinated inclusions in sporadic and Guam amyotrophic lateral sclerosis but not in familial amyotrophic lateral sclerosis with and without SOD1 mutations. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 29, 672–683.

Magistris, M.R. (2006). SLA : diagnostic différentiel et formes frontières.

Maglemose, R., Hedegaard, A., Lehnhoff, J., Dimintyanova, K.P., Moldovan, M., Grøndahl, L., and Meehan, C.F. (2017). Potassium channel abnormalities are consistent with early axon degeneration of motor axons in the G127X SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 292, 154–167.

Magrané, J., Cortez, C., Gan, W.-B., and Manfredi, G. (2014). Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1413–1424.

Majounie, E., Renton, A.E., Mok, K., Dopper, E.G., Waite, A., Rollinson, S., Chiò, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., et al. (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 11, 323–330.

Manetto, V., Sternberger, N.H., Perry, G., Sternberger, L.A., and Gambetti, P. (1988). Phosphorylation of neurofilaments is altered in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 47, 642–653.

Marchetto, M.C.N., Muotri, A.R., Mu, Y., Smith, A.M., Cezar, G.G., and Gage, F.H. (2008). Non-Cell-Autonomous Effect of Human SOD1G37R Astrocytes on Motor Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 649–657.

Martinaud, O., Laquerrière, A., Guyant-Maréchal, L., Ahtoy, P., Vera, P., Sergeant, N., Camuzat, A., Bourgeois, P., Hauw, J.J., Campion, D., et al. (2005). Frontotemporal dementia, motor neuron disease and tauopathy: clinical and neuropathological study in a family. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 110, 84–92.

Martínez-Silva, M. de L., Imhoff-Manuel, R.D., Sharma, A., Heckman, C.J., Shneider, N.A., Roselli, F., Zytynicki, D., and Manuel, M. (2018). Hypoexcitability precedes denervation in the large fast-contracting motor units in two unrelated mouse models of ALS.

Maruyama, H. (2012). [Identification of a new causative gene of amyotrophic lateral sclerosis; optineurin]. *Rinsho Shinkeigaku* 52, 1–5.

Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., et al. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465, 223.

Maselli, R.A., Wollman, R.L., Leung, C., Distad, B., Palombi, S., Richman, D.P., Salazar-Gruoso, E.F., and Roos, R.P. (1993). Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 16, 1193–1203.

Mastrocola, A.S., Kim, S.H., Trinh, A.T., Rodenkirch, L.A., and Tibbetts, R.S. (2013). The RNA-binding Protein Fused in Sarcoma (FUS) Functions Downstream of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) in Response to DNA Damage. *J. Biol. Chem.* 288, 24731–24741.

Mathews, P.M., and Levy, E. (2016). Cystatin C in aging and in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* 32, 38–50.

Matsumoto, G., Inobe, T., Amano, T., Murai, K., Nukina, N., and Mori, N. (2018). N-Acyl dopamine induces aggresome formation without proteasome inhibition and enhances protein aggregation via p62/SQSTM1 expression. *Sci. Rep.* 8, 9585.

Matus, S., Medinas, D.B., and Hetz, C. (2014). Common Ground: Stem Cell Approaches Find Shared Pathways Underlying ALS. *Cell Stem Cell* 14, 697–699.

Maurel, C., Dangoumau, A., Marouillat, S., Brulard, C., Chami, A., Hergesheimer, R., Corcia, P., Blasco, H., Andres, C.R., and Vourc'h, P. (2018). Causative Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Protein Degradation Pathways: a Link to Neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 1–20.

Maury, Y., Côme, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., and Nedelec, S. (2015). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat. Biotechnol.* 33, 89–96.

Maximino, J.R., de Oliveira, G.P., Alves, C.J., and Chadi, G. (2014). Deregulated expression of cytoskeleton related genes in the spinal cord and sciatic nerve of presymptomatic SOD1(G93A) Amyotrophic Lateral Sclerosis mouse model. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 148.

McCluskey, L., Vandriel, S., Elman, L., Van Deerlin, V.M., Powers, J., Boller, A., Wood, E.M., Woo, J., McMillan, C.T., Rascovsky, K., et al. (2014). ALS-Plus Syndrome: Non-Pyramidal Features in a Large ALS Cohort. *J. Neurol. Sci.* 345, 118–124.

McCombe, P.A., Wray, N.R., and Henderson, R.D. (2017). Extra-motor abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: another layer of heterogeneity. *Expert Rev. Neurother.* 17, 561–577.

McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.

Meininger, V., Drory, V.E., Leigh, P.N., Ludolph, A., Robberecht, W., and Silani, V. (2009). Glatiramer acetate has no impact on disease progression in ALS at 40 mg/day: a double-blind, randomized, multicentre, placebo-controlled trial. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 10, 378–383.

Meininger, V., Genge, A., van den Berg, L.H., Robberecht, W., Ludolph, A., Chio, A., Kim, S.H., Leigh, P.N., Kiernan, M.C., Shefner, J.M., et al. (2017). Safety and efficacy of ozanezumab in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 16, 208–216.

Mendell, L.M. (2005). The size principle: a rule describing the recruitment of motoneurons. *J. Neurophysiol.* 93, 3024–3026.

Mendelsohn, A.I., Dasen, J.S., and Jessell, T.M. (2017). Divergent Hox Coding and Evasion of Retinoid Signaling Specifies Motor Neurons Innervating Digit Muscles. *Neuron* 93, 792-805.e4.

Mendonça, D.M.F., Chimelli, L., and Martinez, A.M.B. (2005). Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 925–933.

Menon, P., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2015). Cortical hyperexcitability precedes lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 126, 803–809.

Mertens, J., Paquola, A.C.M., Ku, M., Hatch, E., Böhnke, L., Ladjevardi, S., McGrath, S., Campbell, B., Lee, H., Herdy, J.R., et al. (2015). Directly Reprogrammed Human Neurons Retain

Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects. *Cell Stem Cell*.

Mertens, J., Reid, D., Lau, S., Kim, Y., and Gage, F.H. (2018). Aging in a Dish: iPSC-Derived and Directly Induced Neurons for Studying Brain Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Genet.*

Meyer, K., Ferraiuolo, L., Miranda, C.J., Likhite, S., McElroy, S., Rensch, S., Ditsworth, D., Lagier-Tourenne, C., Smith, R.A., Ravits, J., et al. (2014). Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 829–832.

Meyer, T., Schwan, A., Dullinger, J.S., Brocke, J., Hoffmann, K.-T., Nolte, C.H., Hopt, A., Kopp, U., Andersen, P., Epplen, J.T., et al. (2005). Early-onset ALS with long-term survival associated with spastin gene mutation. *Neurology* *65*, 141–143.

Meyer, T., Maier, A., Borisow, N., Dullinger, J.S., Splettstösser, G., Ohlraun, S., Münch, C., and Linke, P. (2008). Thalidomide causes sinus bradycardia in ALS. *J. Neurol.* *255*, 587–591.

Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* *252*, 1–15.

Milanese, M., Zappettini, S., Onofri, F., Musazzi, L., Tardito, D., Bonifacino, T., Messa, M., Racagni, G., Usai, C., Benfenati, F., et al. Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* *116*, 1028–1042.

Millecamps, S., Salachas, F., Cazeneuve, C., Gordon, P., Bricka, B., Camuzat, A., Guillot-Noël, L., Russaouen, O., Bruneteau, G., Pradat, P.-F., et al. (2010). SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype–phenotype correlations. *J. Med. Genet.* *47*, 554–560.

Millecamps, S., Boillée, S., Le Ber, I., Seilhean, D., Giraudeau, M., Moigneu, C., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Corcia, P., Pradat, P.-F., et al. (2012). Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in *C9ORF72* and patients with mutations in other ALS-related genes. *J. Med. Genet.* *49*, 258–263.

Miller, R., Bradley, W., Cudkovic, M., Hubble, J., Meininger, V., Mitsumoto, H., Moore, D., Pohlmann, H., Sauer, D., Silani, V., et al. (2007a). Phase II/III randomized trial of TCH346 in patients with ALS. *Neurology* *69*, 776–784.

Miller, R.G., Mitchell, J.D., Lyon, M., and Moore, D.H. (2007b). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001447.

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

Miller, T.M., Pestronk, A., David, W., Rothstein, J., Simpson, E., Appel, S.H., Andres, P.L., Mahoney, K., Allred, P., Alexander, K., et al. (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol.* *12*, 435–442.

MinE ALS (2018). CHCHD10 variants in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Where is the evidence? *Ann. Neurol.* *0*.

Mitchell, J., Paul, P., Chen, H.-J., Morris, A., Payling, M., Falchi, M., Habgood, J., Panoutsou, S., Winkler, S., Tisato, V., et al. (2010). Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 7556–7561.

- Mitsui, S., Otomo, A., Nozaki, M., Ono, S., Sato, K., Shirakawa, R., Adachi, H., Aoki, M., Sobue, G., Shang, H.-F., et al. (2018). Systemic overexpression of SQSTM1/p62 accelerates disease onset in a SOD1H46R-expressing ALS mouse model. *Mol. Brain* 11, 30.
- Mitsuyama, Y. (1984). Presenile dementia with motor neuron disease in Japan: clinico-pathological review of 26 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 47, 953–959.
- Mitsuyama, Y., and Takamiya, S. (1979). Presenile dementia with motor neuron disease in Japan. A new entity? *Arch. Neurol.* 36, 592–593.
- Mitsuyama, Y., Kogoh, H., and Ata, K. (1985). Progressive dementia with motor neuron disease. An additional case report and neuropathological review of 20 cases in Japan. *Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.* 235, 1–8.
- Mizuno, Y., Amari, M., Takatama, M., Aizawa, H., Mihara, B., and Okamoto, K. (2006). Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 597–603.
- Mizuno, Y., Fujita, Y., Takatama, M., and Okamoto, K. (2011). Peripherin partially localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 302, 14–18.
- Moisse, K., Volkening, K., Leystra-Lantz, C., Welch, I., Hill, T., and Strong, M.J. (2009). Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: Implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain Res.* 1249, 202–211.
- Mor, A., White, M.A., and Fontoura, B.M.A. (2014). Nuclear trafficking in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 28, 28–35.
- Morahan, J.M., Yu, B., Trent, R.J., and Pamphlett, R. (2009). A genome-wide analysis of brain DNA methylation identifies new candidate genes for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 10, 418–429.
- Moreau, C., Danel, V., Devedjian, J.C., Grolez, G., Timmerman, K., Laloux, C., Petrault, M., Gouel, F., Jonneaux, A., Dutheil, M., et al. (2018). Could Conservative Iron Chelation Lead to Neuroprotection in Amyotrophic Lateral Sclerosis? *Antioxid. Redox Signal.*
- Mori, F., Tanji, K., Miki, Y., and Wakabayashi, K. (2009). Decreased cystatin C immunoreactivity in spinal motor neurons and astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 1200–1206.
- Mori, K., Weng, S.-M., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., Schmid, B., Kretzschmar, H.A., Cruets, M., Van Broeckhoven, C., et al. (2013). The C9orf72 GGGGCC Repeat Is Translated into Aggregating Dipeptide-Repeat Proteins in FTL/ALS. *Science* 339, 1335–1338.
- Morita, K., Kaiya, H., Ikeda, T., and Namba, M. (1987). Presenile dementia combined with amyotrophy: a review of 34 Japanese cases. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 6, 263–277.
- Morita, M., Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Hosler, B., Sapp, P., Englund, E., Mitchell, J.E., Habgood, J.J., de Belleruche, J., Xi, J., et al. (2006). A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology* 66, 839–844.
- Morlando, M., Modigliani, S.D., Torrelli, G., Rosa, A., Carlo, V.D., Caffarelli, E., and Bozzoni, I. (2012). FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. *EMBO J.* 31, 4502–4510.
- Mormone, E., D'Sousa, S., Alexeeva, V., Bederson, M.M., and Germano, I.M. (2014). “Footprint-Free” Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Astrocytes for In Vivo Cell-Based Therapy. *Stem Cells Dev.* 23, 2626–2636.

Muffat, J., Li, Y., Yuan, B., Mitalipova, M., Omer, A., Corcoran, S., Bakiasi, G., Tsai, L.-H., Aubourg, P., Ransohoff, R.M., et al. (2016). Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* 22, 1358–1367.

Murakami, T., Warita, H., Hayashi, T., Sato, K., Manabe, Y., Mizuno, S., Yamane, K., and Abe, K. (2001). A novel SOD1 gene mutation in familial ALS with low penetrance in females. *J. Neurol. Sci.* 189, 45–47.

Muyderman, H., and Chen, T. (2014). Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis – a valid pharmacological target? *Br. J. Pharmacol.* 171, 2191–2205.

Nadjar, Y., Gordon, P., Corcia, P., Bensimon, G., Pieroni, L., Meininger, V., and Salachas, F. (2012). Elevated serum ferritin is associated with reduced survival in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7, e45034.

Nägler, D.K., Sulea, T., and Ménard, R. (1999). Full-Length cDNA of Human Cathepsin F Predicts the Presence of a Cystatin Domain at the N-terminus of the Cysteine Protease Zymogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 313–318.

Nakata, M., Kuwabara, S., Kanai, K., Misawa, S., Tamura, N., Sawai, S., Hattori, T., and Bostock, H. (2006). Distal excitability changes in motor axons in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* 117, 1444–1448.

Nassif, M., Woehlbier, U., and Manque, P.A. (2017). The Enigmatic Role of C9ORF72 in Autophagy. *Front. Neurosci.* 11, 442.

Naujock, M., Stanslowsky, N., Bufler, S., Naumann, M., Reinhardt, P., Sternecker, J., Kefalakes, E., Kassebaum, C., Bursch, F., Lojewski, X., et al. (2016). 4-Aminopyridine Induced Activity Rescues Hypoexcitable Motor Neurons from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells: 4AP rescues ALS iPSC derived motor neurons. *STEM CELLS* 34, 1563–1575.

Naumann, M., Pal, A., Goswami, A., Lojewski, X., Japtok, J., Vehlow, A., Naujock, M., Günther, R., Jin, M., Stanslowsky, N., et al. (2018). Impaired DNA damage response signaling by FUS-NLS mutations leads to neurodegeneration and FUS aggregate formation. *Nat. Commun.* 9.

Nelson, A.D., and Jenkins, P.M. (2017). Axonal Membranes and Their Domains: Assembly and Function of the Axon Initial Segment and Node of Ranvier. *Front. Cell. Neurosci.* 11.

Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., et al. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133.

Ng, A.S.L., and Tan, E.-K. (2017). Intermediate C9orf72 alleles in neurological disorders: does size really matter? *J. Med. Genet.* 54, 591–597.

Nicolas, A., Kenna, K.P., Renton, A.E., Ticozzi, N., Faghri, F., Chia, R., Dominov, J.A., Kenna, B.J., Nalls, M.A., Keagle, P., et al. (2018). Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. *Neuron* 97, 1268–1283.e6.

Nihei, K., McKee, A.C., and Kowall, N.W. (1993). Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 86, 55–64.

Nijssen, J., Comley, L.H., and Hedlund, E. (2017). Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 863–885.

Nijssen, J., Aguila Benitez, J., Hoogstraaten, R., Kee, N., and Hedlund, E. (2018). Axon-seq decodes the motor axon transcriptome and its modulation in response to ALS.

Nishimura, A.L., Mitne-Neto, M., Silva, H.C.A., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J.R.M., Gillingwater, T., Webb, J., et al. (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 822–831.

Nogales-Gadea, G., Garcia-Arumi, E., Andreu, A.L., Cervera, C., and Gamez, J. (2004). A novel exon 5 mutation (N139H) in the SOD1 gene in a Spanish family associated with incomplete penetrance. *J. Neurol. Sci.* 219, 1–6.

Noli, L., Capalbo, A., Ogilvie, C., Khalaf, Y., and Ilic, D. (2015). Discordant Growth of Monozygotic Twins Starts at the Blastocyst Stage: A Case Study. *Stem Cell Rep.* 5, 946–953.

Noto, Y.-I., Shibuya, K., Sato, Y., Kanai, K., Misawa, S., Sawai, S., Mori, M., Uchiyama, T., Iose, S., Nasu, S., et al. (2011). Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: specificity, sensitivity, and a possible prognostic value. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 12, 140–143.

Ogawa, S., Tokumoto, Y., Miyake, J., and Nagamune, T. (2011). Induction of oligodendrocyte differentiation from adult human fibroblast-derived induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 47, 464–469.

Ohi, T., Nabeshima, K., Kato, S., Yazawa, S., and Takechi, S. (2004). Familial amyotrophic lateral sclerosis with His46Arg mutation in Cu/Zn superoxide dismutase presenting characteristic clinical features and Lewy body-like hyaline inclusions. *J. Neurol. Sci.* 225, 19–25.

Okamoto, K., Hirai, S., Amari, M., Watanabe, M., and Sakurai, A. (1993). Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis immunostained with rabbit anti-cystatin C serum. *Neurosci. Lett.* 162, 125–128.

Orlacchio, A., Babalini, C., Borreca, A., Patrono, C., Massa, R., Basaran, S., Munhoz, R.P., Rogaeva, E.A., George-Hyslop, S., H, P., et al. (2010). SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 133, 591–598.

O'Rourke, J.G., Bogdanik, L., Yáñez, A., Lall, D., Wolf, A.J., Muhammad, A.K.M.G., Ho, R., Carmona, S., Vit, J.P., Zarrow, J., et al. (2016). C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science* 351, 1324–1329.

Oskarsson, B., Gendron, T.F., and Staff, N.P. (2018). Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clin. Proc.*

Osler, W. (1880). On heredity in progressive muscular atrophy as illustrated in the Farr family of Vermont.

Ou, S.H., Wu, F., Harrich, D., García-Martínez, L.F., and Gaynor, R.B. (1995). Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J. Virol.* 69, 3584–3596.

Pambo-Pambo, A., Durand, J., and Gueritaud, J.-P. (2009). Early excitability changes in lumbar motoneurons of transgenic SOD1G85R and SOD1G(93A-Low) mice. *J. Neurophysiol.* 102, 3627–3642.

Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J.-Y., Cranstoun, S.D., Bennett, V., Scherer, S.S., and Cooper, E.C. (2006). A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 2599–2613.

Pandya, H., Shen, M.J., Ichikawa, D.M., Sedlock, A.B., Choi, Y., Johnson, K.R., Kim, G., Brown, M.A., Elkahoun, A.G., Maric, D., et al. (2017). Differentiation of human and murine induced pluripotent stem cells to microglia-like cells. *Nat. Neurosci.* 20, 753–759.

- Park, S.B., Kiernan, M.C., and Vucic, S. (2017). Axonal Excitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* 14, 78–90.
- Parkinson, N., Ince, P.G., Smith, M.O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P.M., Morrison, K.E., Pall, H.S., Hardiman, O., Collinge, J., et al. (2006). ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 67, 1074–1077.
- Pascuzzi, R.M., Shefner, J., Chappell, A.S., Bjerke, J.S., Tamura, R., Chaudhry, V., Clawson, L., Haas, L., and Rothstein, J.D. (2010). A phase II trial of talampanel in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 11, 266–271.
- Pasinetti, G.M., Ungar, L.H., Lange, D.J., Yemul, S., Deng, H., Yuan, X., Brown, R.H., Cudkowicz, M.E., Newhall, K., Peskind, E., et al. (2006). Identification of potential CSF biomarkers in ALS. *Neurology* 66, 1218–1222.
- Patani, R. (2016). Generating Diverse Spinal Motor Neuron Subtypes from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016.
- Patthey, C., and Gunhaga, L. (2014). Signaling pathways regulating ectodermal cell fate choices. *Exp. Cell Res.* 321, 11–16.
- Pehar, M., Harlan, B.A., Killoy, K.M., and Vargas, M.R. (2017). Role and Therapeutic Potential of Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 23, 5010–5021.
- Perlson, E., Maday, S., Fu, M.-M., Moughamian, A.J., and Holzbaur, E.L.F. (2010). Retrograde axonal transport: pathways to cell death? *Trends Neurosci.* 33, 335–344.
- Pessoa-Pureur, A.Z. and R. (2017). Intermediate Filaments as a Target of Signaling Mechanisms in Neurotoxicity. *Cytoskelet. - Struct. Dyn. Funct. Dis.*
- Peters, O.M., Cabrera, G.T., Tran, H., Gendron, T.F., McKeon, J.E., Metterville, J., Weiss, A., Wightman, N., Salameh, J., Kim, J., et al. (2015). Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Neuron* 88, 902–909.
- Peyrin, J.-M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., Betuing, S., Pietri, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., et al. (2011). Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab. Chip* 11, 3663–3673.
- Philips, T., and Rothstein, J.D. (2014). Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 262, 111–120.
- Philips, T., Bento-Abreu, A., Nonneman, A., Haeck, W., Staats, K., Geelen, V., Hersmus, N., Küsters, B., Van Den Bosch, L., Van Damme, P., et al. (2013). Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 136, 471–482.
- Piepers, S., Veldink, J.H., de Jong, S.W., van der Tweel, I., van der Pol, W.-L., Uijtendaal, E.V., Schelhaas, H.J., Scheffer, H., de Visser, M., de Jong, J.M.B.V., et al. (2009). Randomized sequential trial of valproic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 66, 227–234.
- Pinsky, L., Finlayson, M.H., Libman, I., and Scott, B.H. (1975). Familial amyotrophic lateral sclerosis with dementia: a second Canadian family. *Clin. Genet.* 7, 186–191.
- Pinto, S., and de Carvalho, M. (2017). Comparison of slow and forced vital capacities on ability to predict survival in ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 18, 528–533.
- Pirooznia, S.K., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2014). Motor neuron death in ALS – programmed by astrocytes? *Neuron* 81, 961–963.

- Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K.R., Huelga, S.C., Moran, J., Liang, T.Y., Ling, S.-C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., et al. (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat. Neurosci.* *14*, 459–468.
- Préhaud, C., Wolff, N., Terrien, E., Lafage, M., Mégret, F., Babault, N., Cordier, F., Tan, G.S., Maitrepierre, E., Ménager, P., et al. (2010). Attenuation of Rabies Virulence: Takeover by the Cytoplasmic Domain of Its Envelope Protein. *Sci Signal* *3*, ra5–ra5.
- Préhaud, C., Lafon, M., and Schnell, M.J. (2014). Neuron generation, regeneration and protection (US PATENT).
- Préhaud, C., Lafon, M., and Lafaye, P. (2016). Nanobodies suitable for neuron degeneration therapy (EUROPEAN PATENT APPLICATION).
- Prell, T., and Grosskreutz, J. (2013). The involvement of the cerebellum in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* *14*, 507–515.
- Preux, P.M., Couratier, P., Boutros-Toni, F., Salle, J.Y., Tabaraud, F., Bernet-Bernady, P., Vallat, J.M., and Dumas, M. (1996). Survival prediction in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Age and clinical form at onset are independent risk factors. *Neuroepidemiology* *15*, 153–160.
- Pribadi, M., Yang, Z., Kim, T.S., Swartz, E.W., Huang, A.Y., Chen, J.A., Dokuru, D., Baek, J., Gao, F., Fua, A.T., et al. (2016). CRISPR-Cas9 targeted deletion of the C9orf72 repeat expansion mutation corrects cellular phenotypes in patient-derived iPS cells. *BioRxiv* 051193.
- Probst-Hensch, N.M., and Morabia, A. (2002). Epidémiologie génétique et susceptibilité génétique au cancer du sein. *Rev. Médicale Suisse*.
- Pugdahl, K., Fuglsang-Frederiksen, A., de Carvalho, M., Johnsen, B., Fawcett, P.R.W., Labarre-Vila, A., Liguori, R., Nix, W.A., and Schofield, I.S. (2007). Generalised sensory system abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: a European multicentre study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *78*, 746–749.
- Puls, I., Jonnakuty, C., LaMonte, B.H., Holzbaur, E.L.F., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M.K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S.J., et al. (2003). Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat. Genet.* *33*, 455–456.
- Pun, S., Santos, A.F., Saxena, S., Xu, L., and Caroni, P. (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat. Neurosci.* *9*, 408–419.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., and Williams, S.M. (2001a). Motor Neuron-Muscle Relationships.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., and Williams, S.M. (2001b). The Motor Unit. *Neurosci.* 2nd Ed.
- Qu, Q., Li, D., Louis, K.R., Li, X., Yang, H., Sun, Q., Crandall, S.R., Tsang, S., Zhou, J., Cox, C.L., et al. (2014). High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1. *Nat. Commun.* *5*, 3449.
- Quinlan, K.A., Schuster, J.E., Fu, R., Siddique, T., and Heckman, C.J. (2011). Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol.* *589*, 2245–2260.
- Rabbitts, T.H., Forster, A., Larson, R., and Nathan, P. (1993). Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nat. Genet.* *4*, 175–180.

- Rao, M.V., Mohan, P.S., Kumar, A., Yuan, A., Montagna, L., Campbell, J., Veeranna, null, Espreafico, E.M., Julien, J.P., and Nixon, R.A. (2011). The myosin Va head domain binds to the neurofilament-L rod and modulates endoplasmic reticulum (ER) content and distribution within axons. *PLoS One* 6, e17087.
- Ravits, J. (2014). Focality, stochasticity and neuroanatomic propagation in ALS pathogenesis. *Exp. Neurol.* 262, 121–126.
- Ravits, J., Appel, S., Baloh, R.H., Barohn, R., Rix Brooks, B., Elman, L., Floeter, M.K., Henderson, C., Lomen-Hoerth, C., Macklis, J.D., et al. (2013). Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: What phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 14, 5–18.
- Reddy, K., Zamiri, B., Stanley, S.Y.R., Macgregor, R.B., and Pearson, C.E. (2013). The Disease-associated r(GGGGCC)_n Repeat from the C9orf72 Gene Forms Tract Length-dependent Uni- and Multimolecular RNA G-quadruplex Structures. *J. Biol. Chem.* 288, 9860–9866.
- Reimer, M.M., Kuscha, V., Wyatt, C., Sørensen, I., Frank, R.E., Knüwer, M., Becker, T., and Becker, C.G. (2009). Sonic hedgehog is a polarized signal for motor neuron regeneration in adult zebrafish. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 15073–15082.
- Reinhardt, P., Glatza, M., Hemmer, K., Tsytsyura, Y., Thiel, C.S., Höing, S., Moritz, S., Parga, J.A., Wagner, L., Bruder, J.M., et al. (2013). Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling. *PLoS One* 8, e59252.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., et al. (2011). A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257–268.
- Renton, A.E., Chiò, A., and Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* 17, 17–23.
- van Rheenen, W., Shatunov, A., Dekker, A.M., McLaughlin, R.L., Diekstra, F.P., Pulit, S.L., van der Spek, R.A.A., Vösa, U., de Jong, S., Robinson, M.R., et al. (2016). Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 48, 1043–1048.
- Richter, B., Sliter, D.A., Herhaus, L., Stolz, A., Wang, C., Beli, P., Zaffagnini, G., Wild, P., Martens, S., Wagner, S.A., et al. (2016). Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 4039–4044.
- Riva, N., Clarelli, F., Domi, T., Cerri, F., Gallia, F., Trimarco, A., Brambilla, P., Lunetta, C., Lazzerini, A., Lauria, G., et al. (2016). Unraveling gene expression profiles in peripheral motor nerve from amyotrophic lateral sclerosis patients: insights into pathogenesis. *Sci. Rep.* 6.
- Robinson, R. (2017). FDA Approves Edaravone for ALS: Phase 3 Trial Finds It Slows Progression. *Neurol. Today* 17, 1.
- Rodriguez-Gonzalez, A., Lin, T., Ikeda, A.K., Simms-Waldrip, T., Fu, C., and Sakamoto, K.M. (2008). Role of the Aggresome Pathway in Cancer: Targeting Histone Deacetylase 6–Dependent Protein Degradation. *Cancer Res.* 68, 2557–2560.
- Rooney, J.P.K., Visser, A.E., D’Ovidio, F., Vermeulen, R., Beghi, E., Chio, A., Veldink, J.H., Logroscino, G., van den Berg, L.H., Hardiman, O., et al. (2017). A case-control study of hormonal exposures as etiologic factors for ALS in women: Euro-MOTOR. *Neurology* 89, 1283–1290.

- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.-X., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59.
- Rosenblum, L.T., Shamamandri-Markandaiah, S., Ghosh, B., Foran, E., Lepore, A.C., Pasinelli, P., and Trotti, D. (2017). Mutation of the caspase-3 cleavage site in the astroglial glutamate transporter EAAT2 delays disease progression and extends lifespan in the SOD1-G93A mouse model of ALS. *Exp. Neurol.* 292, 145–153.
- Rosenfeld, J., King, R.M., Jackson, C.E., Bedlack, R.S., Barohn, R.J., Dick, A., Phillips, L.H., Chapin, J., Gelinas, D.F., and Lou, J.-S. (2008). Creatine monohydrate in ALS: Effects on strength, fatigue, respiratory status and ALSFRS. *Amyotroph. Lateral Scler.* 9, 266–272.
- Rossi, D., Volanti, P., Brambilla, L., Colletti, T., Spataro, R., and Bella, V.L. (2018a). CSF neurofilament proteins as diagnostic and prognostic biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 265, 510–521.
- Rossi, D., Volanti, P., Brambilla, L., Colletti, T., Spataro, R., and La Bella, V. (2018b). CSF neurofilament proteins as diagnostic and prognostic biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 265, 510–521.
- Roybon, L., Lamas, N.J., Garcia, A.D., Yang, E.J., Sattler, R., Lewis, V.J., Kim, Y.A., Kachel, C.A., Rothstein, J.D., Przedborski, S., et al. (2013). Human stem cell-derived spinal cord astrocytes with defined mature or reactive phenotypes. *Cell Rep.* 4, 1035–1048.
- Rozas, P., Bargsted, L., Martínez, F., Hetz, C., and Medinas, D.B. (2017). The ER proteostasis network in ALS: Determining the differential motoneuron vulnerability. *Neurosci. Lett.* 636, 9–15.
- Ruddy, D.M., Parton, M.J., Al-Chalabi, A., Lewis, C.M., Vance, C., Smith, B.N., Leigh, P.N., Powell, J.F., Siddique, T., Postumus Meyjes, E., et al. (2003). Two Families with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Are Linked to a Novel Locus on Chromosome 16q. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 390–396.
- Rudnick, N.D., Griffey, C.J., Guarnieri, P., Gerbino, V., Wang, X., Piersaint, J.A., Tapia, J.C., Rich, M.M., and Maniatis, T. (2017). Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E8294–E8303.
- Ryberg, H., An, J., Darko, S., Lustgarten, J.L., Jaffa, M., Gopalakrishnan, V., Lacomis, D., Cudkowicz, M., and Bowser, R. (2010). Discovery and verification of amyotrophic lateral sclerosis biomarkers by proteomics. *Muscle Nerve* 42, 104–111.
- Sabatelli, M., Conte, A., and Zollino, M. (2013). Clinical and genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: Clinical and genetic heterogeneity of ALS. *Clin. Genet.* 83, 408–416.
- Saberi, S., Stauffer, J.E., Schulte, D.J., and Ravits, J. (2015). Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol. Clin.* 33, 855–876.
- Sances, S., Bruijn, L.I., Chandran, S., Eggan, K., Ho, R., Klim, J.R., Livesey, M.R., Lowry, E., Macklis, J.D., Rushton, D., et al. (2016). Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Nat. Neurosci.* 16, 542–553.
- Sapp, P.C., Hosler, B.A., McKenna-Yasek, D., Chin, W., Gann, A., Genise, H., Gorenstein, J., Huang, M., Sailer, W., Scheffler, M., et al. (2003). Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 397–403.
- Sareen, D., Ebert, A.D., Heins, B.M., McGivern, J.V., Ornelas, L., and Svendsen, C.N. (2012). Inhibition of apoptosis blocks human motor neuron cell death in a stem cell model of spinal muscular atrophy. *PLoS One* 7, e39113.

- Sareen, D., O'Rourke, J.G., Meera, P., Muhammad, A.K.M.G., Grant, S., Simpkinson, M., Bell, S., Carmona, S., Ornelas, L., Sahabian, A., et al. (2013). Targeting RNA Foci in iPSC-Derived Motor Neurons from ALS Patients with a C9ORF72 Repeat Expansion. *Sci. Transl. Med.* 5, 208ra149-208ra149.
- Sasaki, S., and Iwata, M. (1996a). Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47, 535–540.
- Sasaki, S., and Iwata, M. (1996b). Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47, 535–540.
- Sasaki, S., and Iwata, M. (1996c). Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 204, 53–56.
- Sasaki, S., and Iwata, M. (2007). Mitochondrial Alterations in the Spinal Cord of Patients With Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 10–16.
- Sasaki, S., and Maruyama, S. (1992a). Increase in diameter of the axonal initial segment is an early change in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 110, 114–120.
- Sasaki, S., and Maruyama, S. (1992b). Increase in diameter of the axonal initial segment is an early change in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 110, 114–120.
- Sasaki, S., Maruyama, S., Yamane, K., Sakuma, H., and Takeishi, M. (1989). Swellings of proximal axons in a case of motor neuron disease. *Ann. Neurol.* 25, 520–522.
- Sasaki, S., Maruyama, S., Yamane, K., Sakuma, H., and Takeishi, M. (1990). Ultrastructure of swollen proximal axons of anterior horn neurons in motor neuron disease. *J. Neurol. Sci.* 97, 233–240.
- Sasaki, S., Warita, H., Abe, K., and Iwata, M. (2005a). Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 110, 48–56.
- Sasaki, S., Warita, H., Abe, K., and Iwata, M. (2005b). Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 110, 48–56.
- Sasaki, S., Warita, H., Murakami, T., Shibata, N., Komori, T., Abe, K., Kobayashi, M., and Iwata, M. (2005c). Ultrastructural study of aggregates in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 109, 247–255.
- Saxena, S., Cabuy, E., and Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat. Neurosci.* 12, 627–636.
- Schaepdryver, M.D., Jeromin, A., Gille, B., Claeys, K.G., Herbst, V., Brix, B., Damme, P.V., and Poesen, K. (2017). Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* jnnp-2017-316605.
- Schanz, O., Bageac, D., Braun, L., Traynor, B., Lehky, T.J., and Floeter, M.K. (2016). Cortical hyperexcitability in patients with C9orf72 mutations: relationship to phenotype. *Muscle Nerve* 54, 264–269.
- Schiffer, D., and Fiano, V. (2004). Astroglialosis in ALS: possible interpretations according to pathogenetic hypotheses. *Amyotroph. Lateral Scler. Mot. Neuron Disord. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 5, 22–25.

- Schiffer, D., Autilio-Gambetti, L., Chiò, A., Gambetti, P., Giordana, M.T., Gullotta, F., Migheli, A., and Vighiani, M.C. (1991). Ubiquitin in motor neuron disease: study at the light and electron microscope. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *50*, 463–473.
- Schwarz, N., and Leube, R.E. (2016). Intermediate Filaments as Organizers of Cellular Space: How They Affect Mitochondrial Structure and Function. *Cells* *5*.
- Selvaraj, B.T., Livesey, M.R., Zhao, C., Gregory, J.M., James, O.T., Cleary, E.M., Chouhan, A.K., Gane, A.B., Perkins, E.M., Dando, O., et al. (2018). C9ORF72 repeat expansion causes vulnerability of motor neurons to Ca²⁺-permeable AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *Nat. Commun.* *9*.
- Senft, D., and Ronai, Z.A. (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 141–148.
- Senju, S., Haruta, M., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda, T., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., and Nishimura, Y. (2009). Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 1021–1031.
- Seo, W., Servat, A., Cliquet, F., Akinbowale, J., Prehaud, C., Lafon, M., and Sabetta, C. (2017). Comparison of G protein sequences of South African street rabies viruses showing distinct progression of the disease in a mouse model of experimental rabies. *Microbes Infect.* *19*, 485–491.
- Sephton, C.F., Good, S.K., Atkin, S., Dewey, C.M., Mayer, P., Herz, J., and Yu, G. (2010). TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development. *J. Biol. Chem.* *285*, 6826–6834.
- Sephton, C.F., Cenik, C., Kucukural, A., Dammer, E.B., Cenik, B., Han, Y., Dewey, C.M., Roth, F.P., Herz, J., Peng, J., et al. (2011). Identification of Neuronal RNA Targets of TDP-43-containing Ribonucleoprotein Complexes. *J. Biol. Chem.* *286*, 1204–1215.
- Sephton, C.F., Cenik, B., Cenik, B.K., Herz, J., and Yu, G. (2012). TDP-43 in CNS development and function: clues to TDP-43-associated neurodegeneration. *Biol. Chem.* *393*, 589–594.
- Serio, A., Bilican, B., Barmada, S.J., Ando, D.M., Zhao, C., Siller, R., Burr, K., Haghi, G., Story, D., Nishimura, A.L., et al. (2013). Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 4697–4702.
- Sgodda, M., and Cantz, T. (2013). Small but Significant: Inter- and Intrapatient Variations in iPS Cell-based Disease Modeling. *Mol. Ther.* *21*, 5–7.
- Shaltouki, A., Peng, J., Liu, Q., Rao, M.S., and Zeng, X. (2013). Efficient generation of astrocytes from human pluripotent stem cells in defined conditions. *Stem Cells Dayt. Ohio* *31*, 941–952.
- Shaw, P.J., Forrest, V., Ince, P.G., Richardson, J.P., and Wastell, H.J. (1995). CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* *4*, 209–216.
- Shea, T.B., Jung, C., and Pant, H.C. (2003). Does neurofilament phosphorylation regulate axonal transport? *4*.
- Sheelakumari, R., Madhusoodanan, M., Radhakrishnan, A., Ranjith, G., and Thomas, B. (2016). A Potential Biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Can Assessment of Brain Iron Deposition with SWI and Corticospinal Tract Degeneration with DTI Help? *AJNR Am. J. Neuroradiol.* *37*, 252–258.

- Shi, G.-P., Bryant, R.A.R., Riese, R., Verhelst, S., Driessen, C., Li, Z., Bromme, D., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (2000). Role for Cathepsin F in Invariant Chain Processing and Major Histocompatibility Complex Class II Peptide Loading by Macrophages. *J. Exp. Med.* *191*, 1177–1186.
- Shi, Y., Kirwan, P., and Livesey, F.J. (2012a). Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat. Protoc.* *7*, 1836–1846.
- Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H.P.C., and Livesey, F.J. (2012b). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* *15*.
- Shi, Y., Lin, S., Staats, K.A., Li, Y., Chang, W.-H., Hung, S.-T., Hendricks, E., Linares, G.R., Wang, Y., Son, E.Y., et al. (2018). Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nat. Med.* *24*, 313–325.
- Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Sasaki, S., Takeo, K., Matsumoto, S., Shiozawa, Z., Komori, T., Ikemoto, A., Umahara, T., et al. (1994). CuZn superoxide dismutase-like immunoreactivity in Lewy body-like inclusions of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* *179*, 149–152.
- Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H.X., Hung, W.Y., Kato, T., and Asayama, K. (1996). Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *55*, 481–490.
- Shibuya, K., Misawa, S., Arai, K., Nakata, M., Kanai, K., Yoshiyama, Y., Ito, K., Iose, S., Noto, Y., Nasu, S., et al. (2011). Markedly reduced axonal potassium channel expression in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *Exp. Neurol.* *232*, 149–153.
- Shibuya, K., Simon, N.G., Geevasinga, N., Menon, P., Howells, J., Park, S.B., Huynh, W., Noto, Y.-I., Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2017). The evolution of motor cortical dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* *128*, 1075–1082.
- Shoesmith, C.L., Findlater, K., Rowe, A., and Strong, M.J. (2007). Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis with respiratory onset. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *78*, 629–631.
- Shoji, E., Sakurai, H., Nishino, T., Nakahata, T., Heike, T., Awaya, T., Fujii, N., Manabe, Y., Matsuo, M., and Sehara-Fujisawa, A. (2015). Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* *5*, 12831.
- Siddique, T., and Ajroud-Driss, S. (2011). Familial amyotrophic lateral sclerosis, a historical perspective. *Acta Myol.* *30*, 117–120.
- Siddique, T., Figlewicz, D.A., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Rouleau, G., Jeffers, A.J., Sapp, P., Hung, W.Y., Bebout, J., and McKenna-Yasek, D. (1991). Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N. Engl. J. Med.* *324*, 1381–1384.
- Skvortsova, V., Shadrina, M., Slominsky, P., Levitsky, G., Kondratieva, E., Zherebtsova, A., Levitskaya, N., Alekhin, A., Serdyuk, A., and Limborska, S. (2004). Analysis of heavy neurofilament subunit gene polymorphism in Russian patients with sporadic motor neuron disease (MND). *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *12*, 241–244.
- Smith, B.N., Ticozzi, N., Fallini, C., Gkazi, A.S., Topp, S., Kenna, K.P., Scotter, E.L., Kost, J., Keagle, P., Miller, J.W., et al. (2014). Exome-wide Rare Variant Analysis Identifies TUBA4A Mutations Associated with Familial ALS. *Neuron* *84*, 324–331.

- Snider, N.T., and Omary, M.B. (2014). Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 163–177.
- Sohn, P.D., Tracy, T.E., Son, H.-I., Zhou, Y., Leite, R.E.P., Miller, B.L., Seeley, W.W., Grinberg, L.T., and Gan, L. (2016). Acetylated tau destabilizes the cytoskeleton in the axon initial segment and is mislocalized to the somatodendritic compartment. *Mol. Neurodegener.* 11, 47.
- Soldner, F., and Jaenisch, R. (2012). iPSC Disease Modeling. *Science* 338, 1155–1156.
- Soldner, F., and Jaenisch, R. (2017). In Vitro Modeling of Complex Neurological Diseases. In *Genome Editing in Neurosciences*, (Springer, Cham), pp. 1–19.
- Solnica-Krezel, L., and Sepich, D.S. (2012). Gastrulation: Making and Shaping Germ Layers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 687–717.
- Son, E.Y., Ichida, J.K., Wainger, B.J., Toma, J.S., Rafuse, V.F., Woolf, C.J., and Eggan, K. (2011). Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* 9, 205–218.
- Song, A., Ashwell, K.W., and Tracey, D.J. (2000). Development of the rat phrenic nucleus and its connections with brainstem respiratory nuclei. *Anat. Embryol. (Berl.)* 202, 159–177.
- Sorenson, E.J., Windbank, A.J., Mandrekar, J.N., Bamlet, W.R., Appel, S.H., Armon, C., Barkhaus, P.E., Bosch, P., Boylan, K., David, W.S., et al. (2008). Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. *Neurology* 71, 1770–1775.
- Spek, R.A. van der, Rheenen, W. van, Pulit, S.L., Kenna, K.P., Ticozzi, N., Kooyman, M., Mclaughlin, R.L., Moisse, M., Eijk, K.R. van, Vugt, J.J.F.A. van, et al. (2018). Reconsidering the causality of TIA1 mutations in ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 19, 1–3.
- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., et al. (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319, 1668–1672.
- Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neurons diversity. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Stockmann, M., Linta, L., Föhr, K.J., Boeckers, A., Ludolph, A.C., Kuh, G.F., Udvardi, P.T., Proepper, C., Storch, A., Kleger, A., et al. (2013). Developmental and Functional Nature of Human iPSC Derived Motoneurons. *Stem Cell Rev. Rep.* 9, 475–492.
- Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2016). Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res. Rev.* 32, 22–37.
- Strong, M.J., Yang, W., Strong, W.L., Leystra-Lantz, C., Jaffe, H., and Pant, H.C. (2006). Tau protein hyperphosphorylation in sporadic ALS with cognitive impairment. *Neurology* 66, 1770–1771.
- Strong, M.J., Volkening, K., Hammond, R., Yang, W., Strong, W., Leystra-Lantz, C., and Shoemith, C. (2007). TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 320–327.
- Styers, M.L., Salazar, G., Love, R., Peden, A.A., Kowalczyk, A.P., and Faundez, V. (2004). The endo-lysosomal sorting machinery interacts with the intermediate filament cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 15, 5369–5382.
- Su, X.W., Broach, J.R., Connor, J.R., Gerhard, G.S., and Simmons, Z. (2014). Genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: Implications for clinical practice and research: ALS Genetics. *Muscle Nerve* 49, 786–803.

- Subramanian, A., Guo, B., Marsden, M.D., Galic, Z., Kitchen, S., Kacena, A., Brown, H.J., Cheng, G., and Zack, J.A. (2009). Macrophage Differentiation from Embryoid Bodies Derived from Human Embryonic Stem Cells. *J. Stem Cells* 4, 29–45.
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1998). The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J.* 17, 6516–6526.
- Sun, X., Wu, Y., Gu, M., Liu, Z., Ma, Y., Li, J., and Zhang, Y. (2014). Selective filtering defect at the axon initial segment in Alzheimer's disease mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 14271–14276.
- Suthers, G., Laing, N., Wilton, S., Dorosz, S., and Waddy, H. (1994). "Sporadic" motoneuron disease due to familial SOD1 mutation with low penetrance. *Lancet Lond. Engl.* 344, 1773.
- Suzuki, M., McHugh, J., Tork, C., Shelley, B., Klein, S.M., Aebischer, P., and Svendsen, C.N. (2007). GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS. *PLoS One* 2, e689.
- Suzuki, N., Aoki, M., Warita, H., Kato, M., Mizuno, H., Shimakura, N., Akiyama, T., Furuya, H., Hokonohara, T., Iwaki, A., et al. (2010). FALS with FUS mutation in Japan, with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. *J. Hum. Genet.* 55, 252–254.
- Swetha, R.G., Ramaiah, S., and Anbarasu, A. (2017). R521C and R521H mutations in FUS result in weak binding with Karyopherin β 2 leading to Amyotrophic lateral sclerosis: a molecular docking and dynamics study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 35, 2169–2185.
- Swinnen, B., and Robberecht, W. (2014). The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 661–670.
- Swinnen, B., Bento-Abreu, A., Gendron, T.F., Boeynaems, S., Bogaert, E., Nuyts, R., Timmers, M., Scheveneels, W., Hersmus, N., Wang, J., et al. (2018). A zebrafish model for C9orf72 ALS reveals RNA toxicity as a pathogenic mechanism. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 135, 427–443.
- Synofzik, M., Born, C., Rominger, A., Lummel, N., Schöls, L., Biskup, S., Schüle, C., Grasshoff, U., Klopstock, T., and Adamczyk, C. (2014). Targeted high-throughput sequencing identifies a TARDBP mutation as a cause of early-onset FTD without motor neuron disease. *Neurobiol. Aging* 35, 1212.e1-5.
- Takahashi, F., Takei, K., Tsuda, K., and Palumbo, J. (2017). Post-hoc analysis of MCI186-17, the extension study to MCI186-16, the confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of edaravone in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 18, 32–39.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Talbott, E.O., Malek, A.M., and Lacomis, D. (2016). The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 225–238.
- Talman, P., Duong, T., Vucic, S., Mathers, S., Venkatesh, S., Henderson, R., Rowe, D., Schultz, D., Edis, R., Needham, M., et al. (2016). Identification and outcomes of clinical phenotypes in amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease: Australian National Motor Neuron Disease observational cohort. *BMJ Open* 6, e012054.
- Tamura, N., Kuwabara, S., Misawa, S., Kanai, K., Nakata, M., Sawai, S., and Hattori, T. (2006). Increased nodal persistent Na⁺ currents in human neuropathy and motor neuron disease estimated by latent addition. *Clin. Neurophysiol.* 117, 2451–2458.

- Tan, R.H., Kril, J.J., McGinley, C., Hassani, M., Masuda-Suzukake, M., Hasegawa, M., Mito, R., Kiernan, M.C., and Halliday, G.M. (2016). Cerebellar neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis cases with ATXN2 intermediate repeat expansions. *Ann. Neurol.* 79, 295–305.
- Tang, Y., Liu, M.-L., Zang, T., and Zhang, C.-L. (2017). Direct Reprogramming Rather than iPSC-Based Reprogramming Maintains Aging Hallmarks in Human Motor Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 359.
- Tao, Q.-Q., and Wu, Z.-Y. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis: Precise Diagnosis and Individualized Treatment. *Chin. Med. J. (Engl.)* 130, 2269–2272.
- Tapia, M., Wandosell, F., and Garrido, J.J. (2010). Impaired Function of HDAC6 Slows Down Axonal Growth and Interferes with Axon Initial Segment Development. *PLOS ONE* 5, e12908.
- Taylor, L.J., Brown, R.G., Tsermentseli, S., Al-Chalabi, A., Shaw, C.E., Ellis, C.M., Leigh, P.N., and Goldstein, L.H. (2013). Is language impairment more common than executive dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 494–498.
- Taylor Rosenblum, L., and Trotti, D. (2017). EAAT2 and the Molecular Signature of Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Advances in Neurobiology*, pp. 117–136.
- Tchieu, J., Zimmer, B., Fattahi, F., Amin, S., Zeltner, N., Chen, S., and Studer, L. (2017). A Modular Platform for Differentiation of Human PSCs into All Major Ectodermal Lineages. *Cell Stem Cell* 21, 399-410.e7.
- Testa, D., Lovati, R., Ferrarini, M., Salmoiraghi, F., and Filippini, G. (2004). Survival of 793 patients with amyotrophic lateral sclerosis diagnosed over a 28-year period. *Amyotroph. Lateral Scler. Mot. Neuron Disord. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* 5, 208–212.
- Teyssou, E., Takeda, T., Lebon, V., Boillée, S., Doukouré, B., Bataillon, G., Sazdovitch, V., Cazeneuve, C., Meininger, V., LeGuern, E., et al. (2013). Mutations in SQSTM1 encoding p62 in amyotrophic lateral sclerosis: genetics and neuropathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 511–522.
- Thermo Fisher Scientific Inc. Neuronal Profiling BioApplication Guide. 72.
- Tian, N., Leshchyn'ska, I., Welch, J.H., Diakowski, W., Yang, H., Schachner, M., and Sytnyk, V. (2012). Lipid raft-dependent endocytosis of close homolog of adhesion molecule L1 (CHL1) promotes neuritogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 44447–44463.
- Toli, D., Buttigieg, D., Blanchard, S., Lemonnier, T., Lamotte d'Incamps, B., Bellouze, S., Baillat, G., Bohl, D., and Haase, G. (2015). Modeling amyotrophic lateral sclerosis in pure human iPSC-derived motor neurons isolated by a novel FACS double selection technique. *Neurobiol. Dis.* 82, 269–280.
- Towne, C., Raoul, C., Schneider, B.L., and Aebischer, P. (2008). Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 1018–1025.
- Trist, B.G., Davies, K.M., Cottam, V., Genoud, S., Ortega, R., Roudeau, S., Carmona, A., De Silva, K., Wasinger, V., Lewis, S.J.G., et al. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis-like superoxide dismutase 1 proteinopathy is associated with neuronal loss in Parkinson's disease brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 134, 113–127.
- Tsuji, S. (2013). The Neurogenomics View of Neurological Diseases. *JAMA Neurol.* 70, 689–694.
- Tsushima, H., Emanuele, M., Polenghi, A., Esposito, A., Vassalli, M., Barberis, A., Difato, F., and Chieregatti, E. (2015). HDAC6 and RhoA are novel players in Abeta-driven disruption of neuronal polarity. *Nat. Commun.* 6.

Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1824, 68–88.

Turner, M.R., Barnwell, J., Al-Chalabi, A., and Eisen, A. (2012). Young-onset amyotrophic lateral sclerosis: historical and other observations. *Brain* 135, 2883–2891.

Turner, M.R., Bowser, R., Bruijn, L., Dupuis, L., Ludolph, A., McGrath, M., Manfredi, G., Maragakis, N., Miller, R.G., Pullman, S.L., et al. (2013). Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 14, 19–32.

Udagawa, T., Fujioka, Y., Tanaka, M., Honda, D., Yokoi, S., Riku, Y., Ibi, D., Nagai, T., Yamada, K., Watanabe, H., et al. (2015). FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat. Commun.* 6.

UKMND-LiCALS Study Group (2013). Lithium in patients with amyotrophic lateral sclerosis (LiCALS): a phase 3 multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 12, 339–345.

Valdmanis, P.N., Dupre, N., Bouchard, J.-P., Camu, W., Salachas, F., Meininger, V., Strong, M., and Rouleau, G.A. (2007). Three families with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia with evidence of linkage to chromosome 9p. *Arch. Neurol.* 64, 240–245.

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

Van Damme, P., Braeken, D., Callewaert, G., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2005). GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 605–612.

Van Damme, P., Robberecht, W., and Bosch, L.V.D. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Dis. Model. Mech.* 10, 537–549.

Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., and Robberecht, W. (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1762, 1068–1082.

Van Helleputte, L., Benoy, V., and Van Den Bosch, L. (2014). The role of histone deacetylase 6 (HDAC6) in neurodegeneration. *Res. Rep. Biol.* 1.

Van Mossevelde, S., van der Zee, J., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. (2017). Relationship between C9orf72 repeat size and clinical phenotype. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 44, 117–124.

Vance, C., Al-Chalabi, A., Ruddy, D., Smith, B.N., Hu, X., Sreedharan, J., Siddique, T., Schelhaas, H.J., Kusters, B., Troost, D., et al. (2006). Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain J. Neurol.* 129, 868–876.

Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., et al. (2009). Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science* 323, 1208–1211.

Vance, C., Scotter, E.L., Nishimura, A.L., Troakes, C., Mitchell, J.C., Kathe, C., Urwin, H., Manser, C., Miller, C.C., Hortobágyi, T., et al. (2013). ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2676–2688.

Vande Velde, C., McDonald, K.K., Boukhedimi, Y., McAlonis-Downes, M., Lobsiger, C.S., Bel Hadj, S., Zandona, A., Julien, J.-P., Shah, S.B., and Cleveland, D.W. (2011). Misfolded SOD1

associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. *PLoS One* 6, e22031.

Vargas, M.R., and Johnson, J.A. (2010). Astroglialosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 7, 471–481.

Vaur, P., Brugg, B., Mericskay, M., Li, Z., Schmidt, M.S., Vivien, D., Orset, C., Jacotot, E., Brenner, C., and Duplus, E. (2017). Nicotinamide riboside, a form of vitamin B3, protects against excitotoxicity-induced axonal degeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 31, 5440–5452.

Veyrat-Durebex, C., Corcia, P., Mucha, A., Benzimra, S., Mallet, C., Gendrot, C., Moreau, C., Devos, D., Piver, E., Pagès, J.-C., et al. (2014). Iron Metabolism Disturbance in a French Cohort of ALS Patients.

Vieira, M., Fernandes, J., Burgeiro, A., Thomas, G.M., Haganir, R.L., Duarte, C.B., Carvalho, A.L., and Santos, A.E. (2010). Excitotoxicity through Ca²⁺-permeable AMPA receptors requires Ca²⁺-dependent JNK activation. *Neurobiol. Dis.* 40, 645–655.

Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013a). Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav.* 3, 431–457.

Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W., and Milligan, C. (2013b). Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav.* 3, 335–350.

Vu, L.T., and Bowser, R. (2017). Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* 14, 119–134.

Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2006). Axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* 117, 1458–1466.

Vucic, S., and Kiernan, M.C. (2008). Cortical excitability testing distinguishes Kennedy's disease from amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 119, 1088–1096.

Vucic, S., Nicholson, G.A., and Kiernan, M.C. (2008). Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131, 1540–1550.

Vucic, S., Cheah, B.C., and Kiernan, M.C. (2009). Defining the mechanisms that underlie cortical hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 220, 177–182.

Vucic, S., Ziemann, U., Eisen, A., Hallett, M., and Kiernan, M.C. (2013). Transcranial magnetic stimulation and amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiological insights. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 1161–1170.

Wada, T., Honda, M., Minami, I., Tooi, N., Amagai, Y., Nakatsuji, N., and Aiba, K. (2009). Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells. *PLoS One* 4, e6722.

Wainger, B. (2015). Trial: Clinical Trial of Ezogabine (Retigabine) in ALS Subjects | ALS TDI.

Wainger, B.J., Kiskinis, E., Mellin, C., Wiskow, O., Han, S.S.W., Sandoe, J., Perez, N.P., Williams, L.A., Lee, S., Boulting, G., et al. (2014). Intrinsic Membrane Hyperexcitability of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Motor Neurons. *Cell Rep.* 7, 1–11.

- Walhout, R., Verstraete, E., Heuvel, M.P. van den, Veldink, J.H., and Berg, L.H. van den (2018). Patterns of symptom development in patients with motor neuron disease. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 19, 21–28.
- Wang, S., Bates, J., Li, X., Schanz, S., Chandler-Militello, D., Levine, C., Maherali, N., Studer, L., Hochedlinger, K., Windrem, M., et al. (2013). Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell* 12, 252–264.
- Wang, W., Wang, L., Lu, J., Siedlak, S.L., Fujioka, H., Liang, J., Jiang, S., Ma, X., Jiang, Z., da Rocha, E.L., et al. (2016). The Inhibition of TDP-43 Mitochondrial Localization Blocks Its Neuronal Toxicity. *Nat. Med.* 22, 869–878.
- Ward, C.L., Boggio, K.J., Johnson, B.N., Boyd, J.B., Douthwright, S., Shaffer, S.A., Landers, J.E., Glicksman, M.A., and Bosco, D.A. (2014). A loss of FUS/TLS function leads to impaired cellular proliferation. *Cell Death Dis.* 5, e1572.
- Webber, C.L., and Pleschka, K. (1976). Structural and functional characteristics of individual phrenic motoneurons. *Pflugers Arch.* 364, 113–121.
- Webster, C.P., Smith, E.F., Shaw, P.J., and De Vos, K.J. (2017). Protein Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Therapeutic Opportunities? *Front. Mol. Neurosci.* 10.
- Weidberg, H., and Elazar, Z. (2011). TBK1 mediates crosstalk between the innate immune response and autophagy. *Sci. Signal.* 4, pe39.
- Weiss, M.D., Macklin, E.A., Simmons, Z., Knox, A.S., Greenblatt, D.J., Atassi, N., Graves, M., Parziale, N., Salameh, J.S., Quinn, C., et al. (2016). A randomized trial of mexiletine in ALS. *Neurology* 86, 1474–1481.
- Welsem, M. van, J., H., V., M., W., M., J.-J., H., and D., S. (2002). The relationship between Bunina bodies, skein-like inclusions and neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 103, 583–589.
- Westergard, T., Jensen, B.K., Wen, X., Cai, J., Kropf, E., Iacovitti, L., Pasinelli, P., and Trotti, D. (2016). Cell-to-Cell Transmission of Dipeptide Repeat Proteins Linked to C9orf72-ALS/FTD. *Cell Rep.* 17, 645–652.
- Weydt, P., Oeckl, P., Huss, A., Müller, K., Volk, A.E., Kuhle, J., Knehr, A., Andersen, P.M., Prudlo, J., Steinacker, P., et al. (2016). Neurofilament levels as biomarkers in asymptomatic and symptomatic familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 79, 152–158.
- Wikström, J., Paetau, A., Palo, J., Sulkava, R., and Haltia, M. (1982). Classic amyotrophic lateral sclerosis with dementia. *Arch. Neurol.* 39, 681–683.
- van Wilgenburg, B., Browne, C., Vowles, J., and Cowley, S.A. (2013). Efficient, long term production of monocyte-derived macrophages from human pluripotent stem cells under partly-defined and fully-defined conditions. *PLoS One* 8, e71098.
- Williams, K.L., Topp, S., Yang, S., Smith, B., Fifita, J.A., Warraich, S.T., Zhang, K.Y., Farrarwell, N., Vance, C., Hu, X., et al. (2016). C9orf72 mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Nat. Commun.* 7, 11253.
- Wilson, M.E., Boumaza, I., Lacomis, D., and Bowser, R. (2010). Cystatin C: a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 5, e15133.
- Wimmer, V.C., Reid, C.A., So, E.Y.-W., Berkovic, S.F., and Petrou, S. (2010). Axon initial segment dysfunction in epilepsy. *J. Physiol.* 588, 1829–1840.

Wootz, H., Enjin, A., Wallén-Mackenzie, A., Lindholm, D., and Kullander, K. (2010). Reduced VGLUT2 expression increases motor neuron viability in Sod1(G93A) mice. *Neurobiol. Dis.* 37, 58–66.

www.invs.santepubliquefrance.fr La sclérose latérale amyotrophique.

www.ninds.nih.gov (2018). Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Fact Sheet.

Xia, Q., Wang, H., Zhang, Y., Ying, Z., and Wang, G. (2015). Loss of TDP-43 Inhibits Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked Mutant SOD1 Aggresome Formation in an HDAC6-Dependent Manner. *J. Alzheimers Dis. JAD* 45, 373–386.

Xiao, S., McLean, J., and Robertson, J. (2006a). Neuronal intermediate filaments and ALS: A new look at an old question. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1762, 1001–1012.

Xiao, S., McLean, J., and Robertson, J. (2006b). Neuronal intermediate filaments and ALS: a new look at an old question. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 1001–1012.

Xu, Z., Cork, L.C., Griffin, J.W., and Cleveland, D.W. (1993a). Involvement of neurofilaments in motor neuron disease. *J. Cell Sci. Suppl.* 17, 101–108.

Xu, Z., Cork, L.C., Griffin, J.W., and Cleveland, D.W. (1993b). Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73, 23–33.

Xu, Z., Henderson, R.D., David, M., and McCombe, P.A. (2016). Neurofilaments as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One* 11, e0164625.

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

Yamashita, S., and Ando, Y. (2015). Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *Transl. Neurodegener.* 4.

Yamashita, T., Miyamoto, Y., Bando, Y., Ono, T., Kobayashi, S., Doi, A., Araki, T., Kato, Y., Shirakawa, T., Suzuki, Y., et al. (2017). Differentiation of oligodendrocyte progenitor cells from dissociated monolayer and feeder-free cultured pluripotent stem cells. *PloS One* 12, e0171947.

Yan, J., Deng, H.-X., Siddique, N., Fecto, F., Chen, W., Yang, Y., Liu, E., Donkervoort, S., Zheng, J.G., Shi, Y., et al. (2010). Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia(e-Pub ahead of print). *Neurology* 75, 807–814.

Yanagimachi, M.D., Niwa, A., Tanaka, T., Honda-Ozaki, F., Nishimoto, S., Murata, Y., Yasumi, T., Ito, J., Tomida, S., Oshima, K., et al. (2013). Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PloS One* 8, e59243.

Yang, C., Danielson, E.W., Qiao, T., Metterville, J., Brown, R.H., Landers, J.E., and Xu, Z. (2016). Mutant PFN1 causes ALS phenotypes and progressive motor neuron degeneration in mice by a gain of toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E6209–E6218.

Yang, W., Sopper, M.M., Leystra-Lantz, C., and Strong, M.J. (2003). Microtubule-associated tau protein positive neuronal and glial inclusions in ALS. *Neurology* 61, 1766–1773.

Yang, W., Ang, L.C., and Strong, M.J. (2005). Tau protein aggregation in the frontal and entorhinal cortices as a function of aging. *Dev. Brain Res.* 156, 127–138.

- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H.X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W.Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A.C., et al. (2001). The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* *29*, 160–165.
- Yang, Y.M., Gupta, S.K., Kim, K.J., Powers, B.E., Cerqueira, A., Wainger, B.J., Ngo, H.D., Rosowski, K.A., Schein, P.A., Akeifi, C.A., et al. (2013). A Small Molecule Screen in Stem Cell-derived Motor Neurons Identifies a Kinase Inhibitor as a Candidate Therapeutic for ALS. *Cell Stem Cell* *12*, 713–726.
- Ying, H., and Yue, B.Y.J.T. (2016). Optineurin: The autophagy connection. *Exp. Eye Res.* *144*, 73–80.
- Young, P.E., Kum Jew, S., Buckland, M.E., Pamphlett, R., and Suter, C.M. (2017). Epigenetic differences between monozygotic twins discordant for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) provide clues to disease pathogenesis. *PLoS One* *12*, e0182638.
- Yuan, A., Rao, M.V., Sasaki, T., Chen, Y., Kumar, A., Veeranna, null, Liem, R.K.H., Eyer, J., Peterson, A.C., Julien, J.-P., et al. (2006). Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 10006–10019.
- Yuan, A., Yi, Z., Wang, Q., Sun, J., Li, Z., Du, Y., Zhang, C., Yu, T., Fan, J., Li, H., et al. (2012). ANK3 as a risk gene for schizophrenia: new data in Han Chinese and meta analysis. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* *159B*, 997–1005.
- Yuan, A., Rao, M.V., Veeranna, and Nixon, R.A. (2017). Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *9*, a018309.
- Zhang, C., Gao, J., Li, M., Deng, Y., and Jiang, C. (2018). p38 δ MAPK regulates aggresome biogenesis by phosphorylating SQSTM1 in response to proteasomal stress. *J. Cell Sci.* *131*.
- Zhang, R., Miller, R.G., Gascon, R., Champion, S., Katz, J., Lancero, M., Narvaez, A., Honrada, R., Ruvalcaba, D., and McGrath, M.S. (2009a). Circulating endotoxin and systemic immune activation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J. Neuroimmunol.* *206*, 121–124.
- Zhang, Y.-J., Xu, Y.-F., Cook, C., Gendron, T.F., Roettges, P., Link, C.D., Lin, W.-L., Tong, J., Castanedes-Casey, M., Ash, P., et al. (2009b). Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 7607–7612.
- Zhang, Z., Casey, D.M., Julien, J.-P., and Xu, Z. (2002). Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit L. *J. Comp. Neurol.* *450*, 144–152.
- Zhang, Z., Almeida, S., Lu, Y., Nishimura, A.L., Peng, L., Sun, D., Wu, B., Karydas, A.M., Tartaglia, M.C., Fong, J.C., et al. (2013). Downregulation of MicroRNA-9 in iPSC-Derived Neurons of FTD/ALS Patients with TDP-43 Mutations. *PLOS ONE* *8*, e76055.
- Zhao, J., and Liem, R.K.H. (2016). α -Internexin and Peripherin. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 477–507.
- Zheng, W., Li, Q., Zhao, C., Da, Y., Zhang, H.-L., and Chen, Z. (2018). Differentiation of Glial Cells from hiPSCs: Potential Applications in Neurological Diseases and Cell Replacement Therapy. *Front. Cell. Neurosci.* *12*.
- Zheng, Y., Gao, L., Wang, D., and Zang, D. (2017). Elevated levels of ferritin in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neurol. Scand.* *136*, 145–150.
- Zhou, D., Lambert, S., Malen, P.L., Carpenter, S., Boland, L.M., and Bennett, V. (1998). AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J. Cell Biol.* *143*, 1295–1304.

Zhou, S., Szczesna, K., Ochalek, A., Kobilák, J., Varga, E., Nemes, C., Chandrasekaran, A., Rasmussen, M., Cirera, S., Hyttel, P., et al. (2016). Neurosphere Based Differentiation of Human iPSC Improves Astrocyte Differentiation. *Stem Cells Int.* 2016.

Zhu, Y., Yang, M., Li, F., Li, M., Xu, Z., Yang, F., Liu, Y., Chen, W., Zhang, Y., and Xu, R. (2018). Aberrant Levels of Cystatin C in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Systematic Review and Meta Analysis. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 1041–1053.

Ziegler, L., Grigoryan, S., Yang, I.H., Thakor, N.V., and Goldstein, R.S. (2011). Efficient generation of schwann cells from human embryonic stem cell-derived neurospheres. *Stem Cell Rev.* 7, 394–403.

Zoccolella, S., Palagano, G., Fraddosio, A., Russo, I., Ferrannini, E., Serlenga, L., Maggio, F., Lamberti, S., and Iliceto, G. (2002). ALS-plus: 5 cases of concomitant amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 23 Suppl 2, S123-124.

Zonta, B., Desmazieres, A., Rinaldi, A., Tait, S., Sherman, D.L., Nolan, M.F., and Brophy, P.J. (2011). A Critical Role for Neurofascin in Regulating Action Potential Initiation through Maintenance of the Axon Initial Segment. *Neuron* 69, 945–956.

Zou, Z.-Y., Peng, Y., Feng, X.-H., Wang, X.-N., Sun, Q., Liu, M.-S., Li, X.-G., and Cui, L.-Y. (2012). Screening of the FUS gene in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients of Chinese origin: Screening of the FUS gene in Chinese ALS cases. *Eur. J. Neurol.* 19, 977–983.

Zou, Z.-Y., Liu, M.-S., Li, X.-G., and Cui, L.-Y. (2016). Mutations in FUS are the most frequent genetic cause in juvenile sporadic ALS patients of Chinese origin. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 17, 249–252.

Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T.W., Ingram, M.A.C., et al. (2011). Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 260–265.

Zu, T., Liu, Y., Bañez-Coronel, M., Reid, T., Pletnikova, O., Lewis, J., Miller, T.M., Harms, M.B., Falchook, A.E., Subramony, S.H., et al. (2013). RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E4968–E4977.

LISTE DES ABREVIATIONS

- **AH** : Cône d'émergence de l'axone
- **AIS** : Segment initial de l'axone
- **ARNm** : ARN messager
- **BMAA** : β -N-méthylamino-L-alanine
- **CysC** : Cystatine C
- **DFT** : Démence fronto-temporale
- **DPR** : Protéines à motifs dipeptidiques
- **EAAT2** : Excitatory Amino Acid Transporter 2
- **FALS** : Individus atteints d'une forme familiale de SLA
- **FF** : *Fast-Fatiguable*
- **FFR** : *Fast Fatigue-Resistant*
- **HMC** : *Hypaxial motor column*
- **iPSC** : Cellules souches pluripotentes induites humaines
- **JNM** : Jonction neuromusculaire
- **K+** : Potassiques
- **LCR** : Liquide céphalo-rachidien
- **LMC** : *Lateral motor column*
- **miARNs** : microARNs
- **MMC** : *Median motor column*
- **MTs** : Microtubules
- **MN** : Motoneurone
- **Na+** : Sodiques
- **NF-H** : Neurofilaments lourds
- **NF-L** : Neurofilaments légers
- **NF-M** : Neurofilaments médians
- **NFs** : Neurofilaments
- **pNFs** : Neurofilaments phosphorylés
- **PGC** : *Preganglionic motor column*
- **pNFs** : Neurofilaments phosphorylés
- **PRPH** : Périphérine
- **RE** : Réticulum endoplasmique
- **RRM** : Domaines de reconnaissance de l'ARN
- **SAC** : *Spinal accessory column*
- **SALS** : Individus atteints d'une forme sporadique de SLA
- **SFR** : *Slow Fatigue-Resistant*
- **SLA** : Sclérose Latérale Amyotrophique
- **SNC** : Système nerveux central
- **SNP** : Système nerveux périphérique
- **Ub** : Ubiquitine
- **UPR** : *Unfold Proteine Response*
- **UPS** : *Ubiquitin Proteasome Response*

CHAPITRE 1 A 6

Figure 1 Le système nerveux.....	14
Figure 2 Augmentation exponentielle de la découverte des gènes associés à la SLA en fonction du temps et les mécanismes mis en jeu.	15
Figure 3 Les causes génétiques de la SLA en France.	16
Figure 4 Disparité de la fréquence des mutations familiales en France en fonction de l'âge auquel les premiers symptômes apparaissent.	16
Figure 5 Neuropathologie classique de patients atteints de SLA.	28
Figure 6 Distribution des constituants du cytosquelette neuronal.....	31
Figure 7 Structure et assemblage des NFs périphériques et modifications post-transcriptionnelles.	32
Figure 8 ARNs foci et accumulation de protéines dipeptidiques dans les tissus de patients porteurs d'expansions au niveau du gène C9ORF72.....	34
Figure 9 Trois hypothèses mécanistiques de la pathogénie des expansions au niveau du gène C9ORF72	35
Figure 10 Vue d'ensemble : Implication des différents gènes et mécanismes associés à la SLA	40
Figure 11 Homéostasie protéique.....	43
Figure 12 Les protéines associées à la SLA et impliquées dans le métabolisme des ARNs.	45
Figure 13 Transport et cytosquelette.....	47
Figure 14 La voie pyramidale.	52
Figure 15 Les colonnes de MNs sont subdivisées en « pool » de MNs.....	56
Figure 16 Les types de MNs spinaux innervant les différentes fibres musculaires.	58
Figure 17 Le potentiel d'action.....	61
Figure 18 Le segment initial de l'axone.....	64
Figure 19 La répartition des canaux à l' AIS dérivé du soma des MNs α de souris.....	65
Figure 20 La « reproduction » du développement des MNs spinaux in vitro.	71
Figure 21 L'induction neurale.....	71
Figure 22 Spécification des MNs.....	74
Figure 23 Phénotypes observés dans des MNs dérivés d'iPSC porteurs des mutations au niveau du gène SOD1.	89
Figure 24 Découverte des mécanismes communs de la pathogénèse de la SLA via des MNs dérivés d'iPSC issues de formes familiales et sporadiques.....	90
Figure 25 Les essais cliniques.	91
Figure 26 Nombre d'essais cliniques par phase entrepris depuis les années 2000..	92
Figure 27 Proportions de composés testés par phase..	92

CHAPITRE 7

PARTIE 1 : ARTICLE 1

Figure 1. ALS mutations do not prevent MN differentiation and survival in cultures.....	150
Figure 2. Transcriptome profiling to show the efficient differentiation of iPSC into pure culture of spinal MNs of the lateral motor column.....	152
Figure 3. Modifications of electrophysiological properties in ALS motor neurons.	154
Figure 4. Abnormal protein accumulations in ALS iPSC-derived MNs.	156
Figure 5. Neurofilament accumulations in ALS iPSC-derived MNs.	158
Figure 6. Early alterations of the structural integrity of proximal axonal regions in SOD1 and C9ORF72 iPSC-derived MNs.	160
Figure 7. RNA-seq analysis of ALS and control iPSC-derived MNs.....	162
Figure S1. Characterization of iPSC clones.	180
Figure S2. Silencing of retroviral vectors in mutant TARDBP clones.	182
Figure S3. SNP Illumina analysis.	184
Figure S4. Analysis of mutations in ALS patients' cells.	186
Figure S5. Deseq2 normalized gene expression of enzymes involved in neurotransmitters synthesis.....	188
Figure S6. Additional parameters of current-clamp recordings.....	190
Figure S7. Neurofilaments in ALS iPSC-derived MNs.	192
Figure S8. Early alterations of the structural integrity of proximal axonal regions in SOD1 and C9ORF72 iPSC-derived MNs.....	194
Figure S9. RNA-seq analysis to identify early altered mechanisms in ALS MNs.....	196

PARTIE 2 : ARTICLE 2

Figure 1. Generation and characterization of iPSCs and MNs from ALS patients and controls.....	207
Figure 2. ALS patient-derived MNs exhibit cytoplasmic FUS localization and hypoexcitability.....	209
Figure 3. Progressive axonal transport defects in ALS patient-derived MNs.....	210
Figure 4. Axonal transport defects are caused by mutant FUS.....	212
Figure 5. Restoration of axonal transport and of ER-mitochondrial overlay by HDAC6 inhibition.....	213
Figure 6. Effect of genetic HDAC6 knockdown and increased acetylation levels of α -tubulin by HDAC6 inhibition.	215

PARTIE 3

Figure 1 Effet des molécules Neurovitas sur la neuritogénèse	222
---	-----

CHAPITRE 8 ET 9

Figure 1 Sources d'hétérogénéité de la biopsie d'un patient à la modélisation de sa maladie	226
Figure 2 Schéma représentant l'expression des gènes HOX le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière..	228
Figure 3 Schéma représentant la différenciation des astrocytes, neurones, oligodendrocytes, cellules de Schwann, cellules microgliales et macrophages à partir d'iPSC et exemples de molécules utilisées dans les protocoles.....	230
Figure 4 Dégénérescence des neurites	232
Figure 5 MNs dérivés d'iPSC en culture microfluidique.....	233
Figure 6 Réseau neuromusculaire modélisé dans un circuit microfluidique.....	234
Figure 7 MNs dérivés d'iPSC issues d'individus contrôles transduits avec un vecteur lentiviral codant pour la sous-unité $\beta 2$ des canaux sodiques voltage-dépendants couplée à la protéine fluorescente mCherry	236
Figure 8 Vers une médecine de précision	241

CHAPITRE 1 A 6

Tableau 1 Diversité des phénotypes cliniques causés par certaines mutations au niveau des gènes SOD1, TARDBP, FUS et C9ORF72.....	23
Tableau 2 Variabilité des marqueurs neuropathologiques associés à chaque mutation.....	29
Tableau 3 Les différents modèles pour étudier la SLA.	37
Tableau 4 Phénotypes de souris SLA en fonction du gène muté.	38
Tableau 5 Mécanismes pathologiques pouvant être associés aux gènes mutés.	42
Tableau 6 Signes cliniques associés à une atteinte de la voie pyramidale complète ou partielle.....	53
Tableau 7 Excitabilité corticale et spinale des MNs de patients SLA.	55
Tableau 8 Différences au niveau anatomique et fonctionnel des MNs spinaux oculomoteurs et des MNs α -lent et α -rapide.....	60
Tableau 9 Comparaison des différents protocoles publiés pour générer des MNs inférieurs.	73
Tableau 10 Comparaisons des phénotypes de MNs dérivés d'iPSC porteurs de mutation au niveau du gène SOD1.....	76
Tableau 11 Comparaisons des phénotypes des MNs dérivés d'iPSC porteurs des expansions au niveau du gène C9ORF72.	78
Tableau 12 Comparaisons des phénotypes de MNs dérivés d'iPSC porteurs de mutations au niveau du gène TARDBP.....	81
Tableau 13 Comparaisons des phénotypes de MNs dérivés d'iPSC porteurs de mutations au niveau du gène FUS.	83
Tableau 14 Comparaisons des phénotypes de MNs dérivés d'iPSC issus de patients sporadiques.	85
Tableau 15 Comparaisons de l'excitabilité de MNs dérivés d'iPSC issus de patients FALS	86
Tableau 16 Comparaisons des résultats d'analyses transcriptomiques des MNs dérivés d'iPSc issus de patients FALS et SALS.....	87
Tableau 17 Les différents composés testés de la phase II à la phase IV classé en fonction des mécanismes ciblés.....	93
Tableau 18 Les différentes études ayant testées des molécules à visée thérapeutique dans les MNs dérivés d'iPSC.	98

CHAPITRE 7

PARTIE 1 : ARTICLE 1

Table 1. Description of ALS patients and control subjects.....	144
Table 2. Genes of the KEGG “ALS pathway” (hsa05014, P-value=3.63E-02) deregulated in ALS MNs over control MNs between T0 and T1.....	145
Table 3. Genes of the Reactome pathway “Interaction between L1 and Ankyrins”(R-HSA-445095 P-value=6.70E-04) deregulated in ALS MNs over control MNs between T0 and T1.....	146
Table 4. Gene Ontology terms significantly regulated between ALS and control MNs between T0 and T1.....	147
Table 5. Upregulation of CHL1 and CTSF gene expression in SOD1 ^{N139D} , C9ORF72 ^{(G4C2)ⁿ} and TARDBP ^{G348C} MNs compared to control MNs at each time point (xFold change/Adjusted P-Value).....	148
Table S1. Primary antibodies.....	198
Table S2. Secondary Antibodies.....	199
Table S3. Description of ALS patients <i>Post-mortem tissues</i>	199

CHAPITRE 8

Tableau 1 Origine de chaque type cellulaire, marqueurs et protocoles publiés pour les générer	231
--	-----

Défauts intrinsèques de motoneurones spinaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites issues d'individus atteints de différentes formes de Sclérose Latérale Amyotrophique

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la mort des motoneurones (MNs). Malgré plusieurs hypothèses pouvant expliquer les mécanismes à l'origine de leur mort sélective, l'hétérogénéité de la SLA rend difficile la compréhension des causes exactes de la dégénérescence. Dans ce contexte, les cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSC) permettent l'étude des formes familiales de la maladie comme des formes sporadiques. Contrairement à la majorité des travaux publiés à ce jour qui étudient des iPSC de patients porteurs de mutation dans un seul gène de SLA, mon projet a eu pour objectif de comparer plusieurs formes de SLA dans un même contexte expérimental.

A partir d'iPSC issues de patients présentant différentes formes génétiques de SLA (*C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP*), nous avons obtenu des cultures pures de MNs humains. Alors que nous n'avons pas observé de mort des MNs mutants après plusieurs semaines, des études fonctionnelles d'électrophysiologie ont montré une altération tardive de l'excitabilité des MNs en fonction des patients. De façon plus précoce, nous avons observé la présence d'agrégats protéiques communs ou spécifiques aux différentes formes de SLA, avec certaines accumulations localisées au niveau du segment proximal de l'axone, une région importante pour la maintenance de l'identité axonale et le déclenchement des potentiels d'action. Des altérations physiques et/ou moléculaires ont été mises en évidence au niveau de ce segment dans les MNs mutants, suggérant qu'une perturbation du segment proximal de l'axone pourrait être un évènement très précoce altérant ainsi l'intégrité et la fonctionnalité des MNs de patients.

Comparison of motor neuron intrinsic defects in patients with various forms of Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder characterized by motor neurons death (MNs). Despite several hypothesis trying to explain this selective loss, the exact reasons of MNs degeneration remain unidentified mainly due to the disease heterogeneity. In this respect, the use of human induced pluripotent stem cells (iPSC) are opening up opportunities to model not only familial but also sporadic forms of ALS. In comparison to previously published studies, which focus only on one type of ALS mutation, my thesis had the objective to compare in a same experimental context multiple forms of ALS in order to distinguish similarities and discrepancies inherited by the mutation.

Using iPSC obtained from genetic forms of ALS patients (*C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP*) as well as control subjects, we generated pure cultures of human MNs. While ALS MNs were not sensitive to death after few weeks of culture, electrophysiological functional studies revealed a patient-dependent late alteration in MNs excitability. Early defects were also reported, with observations of generic and mutation-specific protein aggregates. Interestingly, some accumulations were localized at the axonal initial segment (AIS) region, which is important for maintaining axonal identity and crucial for action potentials' initiation. Physical and/or molecular alterations were reported at the AIS in ALS MNs, suggesting that AIS perturbation could be an early event in MN degeneration by disruption of ALS patients' MNs integrity and functionality.